Die Diagnose der Geflügeltuberkulose mit Hilfe einer Frischblut-Schnellagglutination

Kurt Hiller

1961

Aus dem Institut für Tierhygiene der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München
Vorstand: Professor Dr. A. Meyn

DIE DIAGNOSE DER GEFLÜGELTUBERKULOSE MIT HILFE EINER FRISCHBLUT-SCHNELLAGGLUTINATION

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der veterinär-medizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Kurt Hiller
Tierarzt
aus
Riedlingen/Wttbg.

München 1961

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Professor Dr. A. Meyn
Referent: Professor Dr. A. Meyn

Tag der Promotion: 26. Juli 1961

UNI-Druck, München 13, Amalienstraße 85

Meiner Mutter

in Dankbarkeit gewidmet

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555212_0110

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. Einleitung	1
II. Literatur	2
III. Eigene Untersuchungen	9
A. Material	9
B. Methodik	11
C. Vorversuche	12
1. Wuchsform und antigenes Verhalten der zur Antigen-Herstellung benutzten Geflügeltuberkelbakterien auf verschiedenen Nährmedien	12
2. Herstellung einer für die Praxis verwendbaren Suspension	17
D. Hauptversuche: Die Frischblut-Schnellagglutination im Vergleich zur Tuberkulinprobe, der pathologisch-anatomischen, mikroskopischen und kulturellen Diagnose, dargestellt in 6 Versuchsreihen	25
IV. Besprechung der Ergebnisse	40
V. Zusammenfassung	45
VI. Literaturverzeichnis	46
Lebenslauf	48

Für die freundliche Überlassung des Themas möchte ich Herrn Professor Dr. A. Meyn meinen ergebensten Dank aussprechen.

Vielen Dank schulde ich Herrn Privat-Dozent Dr. Th. Schliesser für seinen wertvollen Rat und seine jederzeit bereitwilligst gewährte Unterstützung.

I. EINLEITUNG

Die Sanierung von tuberkulös verseuchten Hühnerbeständen hat sich als sehr schwierig erwiesen, da die bisher angewandte "Allergische Untersuchungsmethode" nur einen Teil der erkrankten Tiere erfaßt. Umfangreiche Bemühungen gingen dahin, die Untersuchungstechnik und Art der Anwendung zu verbessern, doch ließen sich auch hier günstigstenfalls nur etwa 80 % aller an Tuberkulose erkrankten Tiere ermitteln. Den Grund dafür vermutet man einerseits in der besonderen allergischen Reaktionslage des Huhnes, zum anderen in einer Verseuchung der Bestände mit Geflügeltuberkelbakterien unterschiedlicher Antigenstruktur.

Abgesehen davon ist die "Allergische Untersuchungsmethode" durch das erforderliche 2 - 4malige Einfangen und Markieren der Tiere recht umständlich und mit viel Zeitverlust und Arbeitsaufwand verbunden.

Erst in den letzten Jahren wurde mit der "Frischblut-Schnellagglutination" ein Verfahren bekannt, das als schnell und treffsicher beschrieben wird.

Die Aufgabe vorliegender Arbeit bestand darin, dieses neue Untersuchungsverfahren auf seine Brauchbarkeit bei der Feststellung der Geflügeltuberkulose zu prüfen.

II. LITERATUR

A. Die intrakutane Tuberkulinprobe beim Geflügel

Zahlreiche Autoren (Rheinhard (17), Gylstorff(11), Bauer und Zimmermann (2), Feldmann (7), Geurden (10) und folg.) berichten über die Unzuverlässigkeit der intrakutanen Allergieprobe bei Hühnern. Nach ihrer Meinung ist das Versagen der Allergieprobe in erster Linie auf anergische Zustände des Organismus infolge fortgeschrittener Erkrankung an Tuberkulose zurückzuführen. Nach einer einmaligen Impfung und Ablesung innerhalb von 36 - 48 Stunden empfehlen sie öftere Wiederholungen derselben in Abständen von 4 bis 6 Wochen. Eine Sanierung der Bestände läßt sich jedoch auf diese Weise nicht erreichen. Immer wieder wurden bei späteren Impfungen erneut Reagenten ermittelt.

Mit umfangreichen Variierungen der Technik und Untersuchungsmethoden suchte man die Treffsicherheit der Allergieprobe zu erhöhen. Nach der Herstellung eines albumosefreien Geflügeltuberkulins verglich Bergmann (3) in einer Reihe von Versuchen Alttuberkulin mit albumosefreiem Tuberkulin und konnte bei letzterem keine besseren Untersuchungsergebnisse ermitteln. Auch Schimpl (19) stellte Versuche mit albumosefreiem Geflügeltuberkulin (Warthausen) in verschiedenen Verdünnungen an und fand, daß in natürlich infizierten Beständen mit mindestens 10 % Fehldiagnosen zu rechnen ist.

Bei den von Eissner (6) durchgeführten Versuchen zur Standardisierung des Geflügeltuberkulins zeigte sich, daß deutliche stammesspezifische Unterschiede in der Antigenstruktur der Geflügeltuberkelbakterien bestehen. Meerschweinchen zeigten nach Infizierung eine höhere Empfindlichkeit auf homologes Tuberkulin als auf heterologes Tuberkulin.

Diese Befunde wurden von Meyn und Schliesser (14), die das Versagen der Tuberkulinprobe weniger auf besondere allergische Zustände beim Huhn, als vielmehr auf eine Infektion mit Tuberkelbakterien unterschiedlicher Antigenstruktur zurückführen, vollauf bestätigt. Nach ihren Angaben kam das Versagen der Tuberkulinprobe sowie 80 % der zweifelhaften Tuberkulinreaktionen nur in 2 von 5 untersuchten Geflügelbeständen vor. Sie empfehlen deshalb zur Herstellung eines Geflügeltuberkulins die Verwendung mehrerer antigenetisch unterschiedlicher Stämme.

Von unspezifischen Tuberkulinreaktionen bei Hühnern berichten Creanga, E. und Cupsa, V. (5). Sie fanden bei 3 - 22 % der mit Hilfe des Hämagglutina-

tionstestes an Paratyphus erkrankt gefundenen Hühnern positive Tuberkulinreaktionen. Die Sektion der Tiere zeigte das Fehlen pathologisch-anatomischer Veränderungen, die für Tuberkulose sprechen würden. Da die angestellten Untersuchungen mit den Monaten der intensiven Eierproduktion (Frühjahr) und dem Ansteigen der Paratyphusantikörper zusammenfielen, besteht der begründete Verdacht, daß bei Erkrankungen an Paratyphus unspezifische Tuberkulinreaktionen auftreten können.

Eingehende Untersuchungen über eine Verbesserung der Technik der Tuberkulin-Kehllappenprobe beim Huhn stellten K. Fritzsche und W. Unruh (9) an. Sie gingen von der Erwägung aus, daß ein Huhn nur in einem bestimmten, aber noch nicht sicher erkannten Infektionszustand, der vielleicht mit dem Ablauf einer Bakteriämie verknüpft ist, positiv reagiert. Nach ihrer Meinung besteht außerdem die Möglichkeit, daß in einem anderen Infektionszustand die eingespritzte Tuberkulinmenge nicht ausreicht, um eine allergische Hautreaktion zu erzeugen. Nachdem durch eine einmalige Impfung nur etwa die Hälfte aller infizierten Tiere erfaßt wurde, schlagen die Autoren zur Erhöhung der Treffsicherheit eine 3malige Tuberkulininjektion von 0,1 ml im Abstand von je einem Tag vor. Bei Nachtuberkulinisierungen nach 3 bis 6 Monaten mit demselben Untersuchungsmodus wurden jedoch immer noch vereinzelte tuberkulöse Tiere ermittelt. (Die Untersuchungen der Autoren gingen auf amerikanische Anregungen zurück. Zitiert nach Fritzsche und Unruh (9)).

Über die Tuberkulinisierung bei Enten berichtet Rotow (18). Er empfiehlt, die Tiere in die zwischen dem Unterkiefer liegende unbefiederte Haut zu impfen. Auch bei Trut- und Perlhühnern soll sich diese Methode bewährt haben. Die Injektionen sind zweimal im Abstand von 48 Stunden vorzunehmen. Die Ablesung erfolgt nach 24 und 48 Stunden nach der ersten und 48 Stunden nach der 2. Injektion.

Eingehend berichten Klein, H. und Steffke, E. (13) über die Leistungsfähigkeit der Tuberkulinprobe beim Geflügel. Nach einer einmaligen Injektion von 0,1 ml streng intrakutan wurden die Ergebnisse nach 36 und 48 Stunden abgelesen. Dabei ergab sich, daß nach einer Ablesung nach 36 Stunden nur etwa die Hälfte der Tiere, die nach 48 Stunden eine positive Reaktion zeigten, erfaßt wurde. Doch auch bei der Kontrolle nach 48 Stunden wurden durch die intrakutane Allergieprobe insgesamt nur etwa die Hälfte aller an Tuberkulose erkrankten Tiere erfaßt. Den Grund dafür sehen sie einmal in einer Infektion der Bestände mit Tuberkulosestämmen, die in ihrer antigenen Struktur stark variieren (siehe Eissner (6), Meyn und Schliesser (14)), zum

anderen in einem bei Hühnern häufigen Vorkommen einer Bakteriämie mit dadurch bedingter Blockierung der zellständigen Antikörper. Es ist nach Meinung der Autoren somit weniger erforderlich, albumosefreies oder gereinigtes Geflügeltuberkulin zu verwenden, als vielmehr durch die Auswahl geeigneter, verschiedenartiger Geflügeltuberkulosebakterienstämme die Wirksamkeit des Geflügeltuberkulins zu erhöhen. Durch die beim Huhn häufige Bakteriämie wird nach ihrer Meinung die Leistungsfähigkeit der Intrakutanprobe nicht viel mehr gesteigert werden können. Sie empfehlen die Allergieprobe deshalb in erster Linie als Herdentest und weniger als Diagnostikum für das Einzeltier.

Zur Verbesserung der allergischen Diagnostik stellten Iliew, T. und Girginow, G. (11) Versuche in zwei Richtungen an. Nach subkutaner Applikation von Tuberkelbakterien im Gemisch mit resorptionsverzögernden Stoffen (Aluminiumhydroxydgel, Fette) tuberkulinisierten sie dreimal intrakutan. Eine stark ausgeprägte Reaktion wurde dadurch zwar erreicht, jedoch erschweren die Verdickungen, die dabei entstehen, die Ablesung der Reaktion. Als weitaus besser wird die zweite Methode betrachtet. Nach einer intradermalen Einspritzung von 0,1 ml 1:1 verdünnten Tuberkulins ins Ohrläppchen wird 48 Stunden später eine zweite Injektion vorgenommen. Die Ablesung erfolgt 24 Stunden nach der zweiten Injektion, verbunden mit einer 3. Injektion, die 24 Stunden später abgelesen wird. Mittels der 2maligen Tuberkulinprobe wurden 23,57 % und mit den dreimaligen 30,25 % der an Tuberkulose erkrankten Tiere erfaßt. Hühner mit deutlichen klinischen Symptomen von Tuberkulose reagierten nicht.

Zur Diagnostik von Tuberkulose bei Puten empfiehlt Stschepilow, N.S. (20) die Injektion von 0,1 - 0,15 ml Tuberkulin in die Haut am Schnabelwinkel. Nach 24 Stunden erwiesen sich von 685 Tieren, die auf eine Impfung mit der üblichen Methode negativ reagiert hatten, 1,9 % als positiv. Die Sektion bestätigte den Befund.

B. Die Frischblut-Schnellagglutination

Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, daß auf einer Glasplatte ein Tropfen Antigen mit einem Tropfen Frischblut vermischt wird. Die Schwierigkeiten liegen in der Gewinnung eines stabilen, homogenen Antigens, das sich als spezifisch erweist und ein hohes Agglutinationsvermögen besitzt. Dieses Problem ist der Grund dafür, daß sich nach früheren Versuchen erst in den letzten Jahren wieder ausländische Forscher damit befaßten.

Lange galt es geradezu als unmöglich, eine brauchbare, homogene stabile Suspension von Tuberkelbakterien herzustellen. Untersuchungen im Jahre 1938 von Chiti (4) befaßten sich zwar mit diesem Problem, doch war die Zielsetzung der Forschungen noch eine ganz andere. Es ging darum, die Unterschiede zwischen Tuberkelbakterien der Säugetiere und denen des Typus gallinaceus zu bestimmen.

Chiti versuchte, auf Eiernährböden oder Glycerinagar gezüchtete Kulturen im Achatmörser zu zerreiben und auf eine Dichte von 2 - 10 mg in 1 ccm Lösungsmittel (welches Lösungsmittel ist nicht angegeben) aufzuschwemmen. Da die Suspension von vornherein nicht homogen war, zentrifugierte er entweder mit der Handzentrifuge, ganz kurz mit der elektrischen Zentrifuge oder ließ die Aufschwemmung einige Tage im Kühlschrank stehen. Die milchigtrüben Suspensionen, die er dadurch erhielt, besaßen eine Konzentration von etwa 12 mg Bakterienmasse pro 1 ccm Lösungsmittel, waren jedoch nicht stabil und agglutinierten nach Aufbewahrung bei 37° C schon nach ein paar Tagen spontan. Er fand außerdem, daß dichtere Suspensionen eine Agglutination zwar wesentlich begünstigen, jedoch den Nachteil haben, weniger stabil zu sein. Nicht selten zeigten verschiedene Kulturen desselben Stammes eine ungleichmäßige Agglutinabilität. Den Grund dafür vermutet er bei den jeweiligen Züchtungsbedingungen. Bei Agglutinationsversuchen mit Stämmen der R-Form benützte er Aufschwemmungen, die etwa 1/10 - 1/20 mg Bakterienmasse pro 1 ccm Lösungsmittel enthielten und während 2 Stunden Dauer bei 60° C im Wasserbad abgetötet worden waren.

Abel (1), der ebenfalls Schwierigkeiten bei der Suspensionsherstellung hatte und dessen Versuchsanordnung im Prinzip dieselbe ist wie bei Chiti (4), setzte im Jahre 1940 die oben beschriebene Versuchsreihe fort. Bei hoher Umdrehungszahl zentrifugierte er 1/2 Minute lang. Stämme, die in der R-Form wuchsen, erforderten ein zweimaliges Zentrifugieren, wodurch die Aufschwemmungen eine Dichte von 1/5 - 1/10 mg Bakterienmasse pro 1 ccm Lösungsmittel erlangten. Die Folge dieser schwachen Suspension war eine erschwerte Beurteilung der Agglutinationen. Die bei 70° C und 2 Stunden Dauer abgetöteten, mit 0,5 % Phenol konservierten Aufschwemmungen bewahrte er im Kühlschrank auf.

Während die bisher beschriebenen Arbeitsmethoden ausschließlich Versuche darstellten mit dem Zweck, die Tuberkelbakterien typenserologisch zu unterscheiden, wurde erst im Jahre 1943 mit der Arbeit von Moses, H.E., Feldmann, W.H. und Mann, F.G. (15) der Weg gewiesen, mit Hilfe der Agglutination Tuberkulose bei Hühnern zu diagnostizieren.

Die Forscher hatten mit der Herstellung einer stabilen Bakteriensuspension Erfolg, verwandten jedoch für ihren Test noch Serum, was sich wohl für eine Anwendung im Labor, doch weniger in der Praxis von Vorteil erwies.

In Anlehnung an die Arbeiten von Moses, Feldmann und Mann entwickelten schließlich Karlson, A.G., Zinober, M.R. und Feldmann, W.H. (12) als brauchbarere Methode die "Frischblut-Schnellagglutination", die wegen ihrer Einfachheit und ihrem geringen Zeitaufwand im Stall vorgenommen werden kann. Ihr Hauptaugenmerk legten sie dabei weniger auf die Antigenherstellung als auf eine Auswahl von geeigneten Kulturen, die eine homogene stabile Suspension lieferten. Dazu standen ihnen 40 Stämme zur Verfügung, von denen 15 schon 2 bis 5 Jahre hindurch auf Eigelbagar gezüchtet, und 25, die frisch aus Hühnern isoliert worden waren.

Auf einem flüssigen Nährboden sowie auf Eigelbagar wurden die Bakterien 3 Wochen bei 37° C gezüchtet, zentrifugiert oder abgeschwemmt und 3mal mit sterilem Wasser, dem 0,5 % Phenol beigegeben war, gewaschen. Die Bakterienmassen schwemmten die amerikanischen Autoren mit physiologischer Kochsalzlösung, die wiederum 0,5 % Phenol enthielt, auf eine Dichte von 10 % auf. Von diesen Aufschwemmungen zeigten 17 eine spontane Agglutination, wenn sie auf eine warme Glasplatte gebracht wurden. Die Bakterien verklumpten sowohl bei Zugabe von physiologischer Kochsalzlösung, normalem Pferdeserum, als auch mit Serum tuberkulöser Hühner. Da die Kulturen sowohl von alten, als auch frisch gewonnenen Stämmen herrührten, sowie auf flüssigen und festen Nährböden gezüchtet worden waren, blieb offen, ob diese Auto-Agglutination eine Eigenschaft der Stämme selbst oder eine Folge der jeweiligen Züchtungsbedingungen war.

Die restlichen 23 Stämme wurden mit Seren von gesunden und tuberkulösen Hühnern, die aus verschiedenen Beständen stammten, geprüft. Dabei zeigten mit dem normalen Hühnerserum wiederum 10 Suspensionen Reaktionen, deren Ursache nicht erklärt werden konnte. Schließlich erwiesen sich nur noch 5 Aufschwemmungen als stabil und brauchbar, nachdem 8 Antigene noch wegen zu schwachem Agglutinationsvermögen ausgeschieden waren. Von diesen 5 Antigenen stammten 4 aus frisch gewonnenen und eines aus alten Kulturen.

Die amerikanischen Autoren prüften ihre "Frischblut-Schnellagglutination" im Vergleich zur intrakutanen Tuberkulinprobe an 282 Hühnern, die aus 4 verschiedenen Beständen stammten. Die Agglutination wurde bei Ablesen der Tuberkulinreaktion vorgenommen. Sie stellten dabei auch an 40 gesunden Hühnern fest, daß die Tuberkulinisierung nach Ablauf von 48 Stunden keine

positive Agglutination bewirkte.

Von den 282 untersuchten Hühnern reagierten 42 sowohl auf den Tuberkulintest als auch auf die Agglutinationsprobe. Kein Huhn zeigte eine positive Tuberkulinprobe und gleichzeitig ein negatives Agglutinationsergebnis. Dagegen agglutinierte Blut von 14 Hühnern, die tuberkulinnegativ waren. Nur bei zweien dieser Tiere konnte eine Tuberkulose faktisch nachgewiesen werden, doch war bekannt, daß alle 14 Tiere aus verseuchten Beständen stammten. In Beständen, in denen kein Huhn auf die Tuberkulinprobe reagiert hatte, wurden auch keine Agglutinationen beobachtet.

Gestützt auf die Erfahrungen der amerikanischen Autoren, führte Prochorov (16) in der UdSSR umfangreiche Untersuchungen über die Methode der "Frischblut-Schnellagglutination" durch. Er befaßte sich mit 130 aviären Tuberkulosestämmen, die aus toten Hühnern und Gänsen isoliert worden waren. Nur einen einzigen Stamm konnte er davon gewinnen, der scharf ausgeprägte antigene Eigenschaften besaß. Diesen Stamm züchtete er in Röhrchen bei 39° C - 40° C während 30 Tage auf einem Kartoffelnährmedium. Die Kulturen schwemmte er mit einer sterilen physiologischen Lösung (welche Lösung ist nicht angegeben), die 0,2 % Formalin enthielt, durch Drehen der Röhrchen zwischen den Handflächen ab. Die gewonnene Emulsion schüttelte er mit Glasperlen bis zu einer gleichmäßigen Homogenisierung. Nach zweimaliger Waschung mit einer sterilen physiologischen, 0,2 % Formalin enthaltenden Lösung schwemmte er den Bodensatz zu einer Dichte von 7 - 8 Milliarden Keime pro 1 ccm Lösungsmittel auf. Die fertige Suspension, die 0,4 % zitronensaures Natrium enthielt, erwärmte er im Wasserbad auf 80° C und stellte beim Abkühlen auf pH = 7 ein. (Durch 1 %ige Lösungen von Natriumcarbonat und Zitronen- oder Oxalsäure). Das Antigen bewahrte er im Kühlschrank bei einer Temperatur von 2° - 4° C auf. Der Stamm zeigte Selbstagglutination nach Gefrieren, Zugabe von Alkohol, Äther, Farbstoffen und weiteren Reagentien.

Prochorov (16) prüfte die Agglutinationsmethode im Vergleich zur Tuberkulinierung sowohl an experimentell mit Tuberkulose infizierten, als auch an natürlich infizierten Tieren.

Insgesamt untersuchte er 23 355 Tiere, davon 19 395 Hühner, 292 Gänse, 97 Enten und 7 Truthühner. Davon reagierten mit der Allergiemethode positiv 756 (3,2 %) Tiere. Von den 22 599 Tieren, die nicht auf Tuberkulin reagiert hatten, ergab die Agglutinationsprobe noch bei 2 079 (8,4 %) Tieren ein positives Ergebnis. Bei den in der Agglutination positiven Tieren wurden in einer großen Zahl der Fälle sichtbare tuberkulöse Veränderungen oder posi-

tive bakteriologische Befunde festgestellt.

Nach einer zweijährigen Erfahrung mit den Untersuchungsmethoden von Prochorov schlagen Fomina, A.J., Kontrimawitschuss, L.M. und Prochorov, A.W. (8) vor, die "Frischblut-Schnellagglutination" gleichzeitig mit der Tuberkulinprobe anzuwenden. Auf diese Weise halten sie es für möglich, verseuchte Bestände innerhalb 1 - 1 1/2 Jahren zu sanieren.

III. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

A. Material:

a) Auf ihre Eignung als Antigen wurden folgende 25 Stämme von Geflügeltuberkelbakterien aus der Stammsammlung des Tierhygiene Institutes geprüft:

Stamm-Nr.	Datum d. Isolierung	Einsendungsmaterial
1	Frühjahr 1958	Organe v. tuberkulösen Hühnern
3	"	"
4	"	"
5	"	"
7	"	"
8	"	"
9	"	"
10	"	"
12	"	"
27	Stammsammlung Tierhygiene Institut	
32	4.3.1957	Leber, Taube
56	Stammsammlung Tierhygiene Institut	
99	19.7.1957	Rachenlymphknoten, Bulle
131	4.6.1956	Halslymphknoten, Kind
191	7.3.1958	Lymphknoten, Bulle
211	22.5.1958	Lymphknoten, Bulle
234	10.9.1958	Leber, Schwein
235	19.9.1958	Organe, Kuh
252	13.11.1958	Organe, Katze
258	27.11.1958	Uterus, Kuh
273	10.1.1959	Organe, Huhn
301	15.7.1959	Rachenlymphknoten, Bulle
623	Stammsammlung Tierhygiene Institut	
748	" "	
10/60	11.2.1960	Organe, Kuh

b) Zu weiteren Untersuchungen wurden 28 Stämme von Mycobacterium avium und 7 Stämme apathogener, säurefester Saprophyten, aus der Stammsammlung des Tierhygiene Instituts, mit den Nr. 631/II, 632, 17, 525, 404, 212 herangezogen.

c) Nährböden:
Es wurden 6 verschiedene Nährböden benutzt, 3 flüssige und drei feste.

Flüssige Nährböden: "Besredka", "Sauton", "Glycerinbouillon".

Feste Nährböden: "Löwenstein-Jensen", "Petragnani mit Glycerin" und "Hohn-Gottsacker".

Die dafür verwendeten Rezepte wurden aus dem Buch von Hallmann: "Bakteriologische Nährböden" (Stuttgart, 1953) Seite 174, 176, 177, 170 und 234 entnommen.

Die "Glycerin-Bouillon" wurde nach folgendem Rezept hergestellt:

0,5 % Pepton (Witte)
0,3 % Rinderfleischextrakt (Liebig)
pH = 7,0
7 % Glycerin

d) Insgesamt standen 554 Hühner zur Verfügung, die in 5 Gruppen für die Untersuchungen herangezogen wurden:

Gruppe 1: 3 künstlich oral mit Mycobact. avium infizierte Hühner, 3 natürlich infizierte Hühner (tuberkulinpositiv) aus einem verseuchten Geflügelbestand, 6 tuberkulinnegative Hühner.

Gruppe 2: 3 Hühnerbestände mit zusammen 126 Hühnern, rebhuhnfarbige und weiße "Italiener", im Alter von 1/2 bis 3 Jahren.

In einem dieser Bestände reagierten von 67 Tieren 20 eindeutig auf die Tuberkulin- bzw. Agglutinationsprobe. Diese 20 Hühner wurden im Institut für weitere Versuche verwendet.

Gruppe 3: 30 Hähne, weiße "Italiener", 2 1/2 Monate alt, aus einem größeren Zuchtbetrieb, die mit verschiedenen Stämmen von Mycobakt. avium intravenös infiziert wurden.

Gruppe 4: 371 Hühner, rebhuhnfarbige "Italiener", 1 - 2 Jahre alt, aus einem Zuchtbetrieb, der im Laufe von 2 Jahren fünf Mal eine Aussonderung auf die Tuberkulinprobe positiv reagierender Tiere durchgeführt hatte.

Gruppe 5: 15 Hühner und 2 Truthähne, die ans Pathologisch-Anatomische Institut der Universität München eingesandt wurden.

e) Für Tuberkulinproben wurde Geflügeltuberkulin "Warthausen" der Kontroll-Nr. 570 verwendet.

B. Methodik:

1.) Herstellung der Bakteriensuspension

Zur Gewinnung der benötigten Keimmengen wurden Tuberkulose-Nährböden mit den entsprechenden Stämmen beimpft und 21 Tage bei 37° C bebrütet. Der Bakterienrasen wurde dann mittels einer Drahtöse oder eines Spatels vorsichtig von der Nährbodenoberfläche abgenommen und unter Zugabe von physiologischer Kochsalzlösung, die 0,5 % Phenol enthielt, mit Hilfe eines Glasstabes zerrieben. Die Keime wurden danach mit physiologischer NaCl-Lösung durch zweimaliges Zentrifugieren (10 Min. bei 3 000 U/Min.) gewaschen. Der Bodensatz wurde auf einer Mikrowaage abgewogen und mit physiologischer NaCl-Lösung, die 0,5 % Phenol und 0,4 % Natriumcitrat enthielt, zu einer 10 %igen Suspension aufgeschwemmt. Die Aufschwemmung wurde bei +4° C im Kühlschrank aufbewahrt.

Nähere Einzelheiten der Herstellung sind bei den einzelnen Versuchsreihen eingehend beschrieben.

2.) Agglutinationstechnik

Das Blut wurde bei den Hühnern an der Flügelvene entnommen. Die Flügelvene wurde mit einer Kanüle, einem Schnepper, oder einer Blutlanzette (Firma Stieffenhofer) angestochen. Um das Ergebnis nicht durch äußere Faktoren zu beeinflussen, wurden die Agglutinationen in staubfreien, hellen Räumen oder im Freien vorgenommen.

Zu 2 Tropfen Blut wurde 1 Tropfen Antigen mit einer Tropfpipette auf einen Objektträger gebracht, der mit der Hand rasch hin und hergeschwenkt wurde, um eine gute Durchmischung der beiden Flüssigkeiten zu erreichen.

Das Ergebnis konnte in der Regel schon nach 10 - 20 Sekunden abgelesen werden.

Bei den Vorversuchen wurde Zitratblut benutzt, das 3,8 % Natriumzitrat enthielt.

C. Vorversuche:

1.) Die Auswahl eines geeigneten Nährbodens für die zur Antigenherstellung benutzten Geflügeltuberkelbakterien

25 Stämme von Mycobacterium avium wurden auf verschiedenen Nährböden gezüchtet, um festzustellen, unter welchen Bedingungen die Herstellung einer homogenen, stabilen und gut agglutinierenden Keimsuspension möglich war. Beurteilt wurde das Wachstumsverhalten auf den Nährböden (Dissoziationsform), die Spontanagglutination in physiologischer NaCl-Lösung und im Normalblut sowie das spezifische Agglutinationsvermögen mit Blut und Serum von tuberkulösen Hühnern und einem tuberkulösen Kaninchen.

a) Das Verhalten der auf Löwenstein-Jensen-Nährboden gezüchteten Stämme

Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in Tabelle 1 zusammengestellt worden.

Wuchsform: Die auf Löwenstein-Jensen-Nährboden gezüchteten Kulturen zeigten üppiges Wachstum, das schon nach 6 Tagen festgestellt werden konnte. Die Bakterienrasen hielten sich in den mit Paraffin verschlossenen Röhrchen gut feucht. Es zeigte sich jedoch, daß die Form des Wachstums recht unterschiedlich war. So fanden sich neben feuchten, schmierigen, ganz glatten, homogenen Kulturen (S-Form), solche, die trockener oder von zäher Konsistenz waren, und deren Oberfläche meistens von kugeligen oder halbkugeligen Erhebungen geformt waren (Übergangsform von S zu R). Kulturen, die rein in der R-Form wuchsen, wiesen sich durch eine vorwiegend trockene, krümelige Beschaffenheit aus.

Suspendierung: Am besten ließen sich Kulturmassen der reinen S-Form, die einen völlig feuchten, schmierigen, glatten, homogenen Bakterienrasen bildeten, aufschwemmen (Stämme Nr. 1, 9, 10, 211, 235, 301, 10/60). Bei diesen Stämmen wurde schon nach 2 - 3 Minuten durch eine Zerreibung mit dem Glasstab eine milchige, homogene Suspension erreicht. Leichte Spontanagglutination in physiologischer NaCl-Lösung zeigte der Stamm 301. Die anderen Stämme blieben stabil.

Tabelle 1: Wuchsform und antigenes Verhalten der auf Löwenstein-Jensen-Nährboden gezüchteten Geflügeltuberkelbakterien

Stamm-Nr.	Wuchsform	Agglutinationen mit: Physiol. NaCl Lösung	Normalblut 2 ges. Hühner	Normalserum 2 ges. Hühner	Normalblut Kaninchen	Tuberkulöses Kaninchen Blut	Tuberkulöses Kaninchen Serum	Blut und Serum tuberkulöser Hühner Nr. 1 Blut	Nr. 1 Serum	Nr. 2 Blut	Nr. 3 Blut	Nr. 3 Serum	Nr. 4 Blut	Nr. 4 Serum	Nr. 5 Blut	Nr. 5 Serum	Nr. 6 Blut	Nr. 6 Serum
1	S	-	-	-	-	-	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
3	R	+++	nicht weiter untersucht															
4	S	-	++	-	-	-	-	++	-	++	+	-	++++	+	++++	-		
5	R	+++	nicht weiter untersucht															
7	S	+	++	-	-	-	-	++	-	++	++	-	+++	-	++++	-		
8	S	-	+	+	-	-	++	++++	++++	++++	+	-	++++	++++	++++	++++		
9	S	-	+	-	-	-	-	++++	-	++++	-	-	++++	+++	++++	+++		
10	S	-	-	-	-	-	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++		
12	R	++++	nicht weiter untersucht															
27	R	++++	nicht weiter untersucht															
32	R	++++	nicht weiter untersucht															
56	R	++++	nicht weiter untersucht															
99	R-S	+++	nicht weiter untersucht															
131	S	-	-	-	-	-	-	++++	++++	++++	-	-	++++	++++	++++	++++		
191	R-S	+	-	-	-	-	-	++++	++++	++++	-	-	++++	++++	++++	++++		
211	S-R	-	-	-	-	-	-	++++	++++	++++	-	-	++++	++++	++++	++++		
234	S	-	-	-	-	-	-	++++	++++	++++	+	-	++++	++	+++	+		
235	S	-	-	-	-	-	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++		
252	R-S	++++	nicht weiter untersucht															
258	S-R	++	-	-	-	-	-	++++	++++	++++	-	-	++++	++++	++++	++++		
273	S	-	-	-	-	-	-	++++	++++	++++	+	-	++++	++++	++++	++++		
301	S	+	-	-	-	-	-	+++	-	+++	-	-	++++	-	++++	+		
623	S	+++	nicht weiter untersucht															
748	R-S	+++	nicht weiter untersucht															
10/60	S	-	-	-	-	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++

Tabelle 2: Wuchsform und antigenes Verhalten der auf Petragnani mit Glycerin gezüchteten Geflügeltuberkelbakterien

Stamm-Nr.	Wuchsform	Agglutinationen mit: Physiol. NaCl Lösung	Normalblut 2 ges. Hühner	Normalserum 2 ges. Hühner	Normalblut Kaninchen	Tuberkulöses Kaninchen Blut	Tuberkulöses Kaninchen Serum	Blut und Serum tuberkulöser Hühner: Nr. 1 Blut	Nr. 1 Serum	Nr. 2 Blut	Nr. 2 Serum	Nr. 3 Blut	Nr. 4 Blut	Nr. 4 Serum	Nr. 6 Blut	Nr. 6 Serum
1	S	-	-	-	-	-	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
3	R-S	+++	nicht weiter untersucht													
4	S	++	++	-	-	-	-	++++	++++	++++	-	++++	++	-	++++	++++
5	R	++++	nicht weiter untersucht													
7	S	+++	nicht weiter untersucht													
8	R-S	++++	nicht weiter untersucht													
9	S	++	-	-	-	-	-	++++	++++	++++	+++	++++	+++	-	++++	++++
10	S	-	-	-	-	-	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
12	R-S	++++	nicht weiter untersucht													
27	R	++++	nicht weiter untersucht													
32	R	++++	nicht weiter untersucht													
56	R	++++	nicht weiter untersucht													
99	R-S	++++	nicht weiter untersucht													
131	S	-	-	-	-	-	-	++++	++++	++++	++++	++++	++++	-	++++	++++
191	S	+++	nicht weiter untersucht													
211	S	-	-	-	-	-	-	++++	++++	++++	++	++++	++++	-	+++	++
234	S	+++	nicht weiter untersucht													
235	S	-	-	-	-	-	++++	+++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
252	R-S	++++	nicht weiter untersucht													
258	S	+++	nicht weiter untersucht													
273	R	++++	nicht weiter untersucht													
301	R	++++	nicht weiter untersucht													
623	S	+++	nicht weiter untersucht													
748	R-S	++++	nicht weiter untersucht													
10/60	S	++++	nicht weiter untersucht													

Dagegen konnten die übrigen in S-Form wachsenden Stämme (Nr. 4, 7, 8, 131, 234, 273, 623) sowie Stämme der Übergangsformen (Nr. 99, 191, 252, 258, 748) nur mit Mühe durch 10 Minuten dauerndes intensives Zerreiben der Bakterienmassen homogen aufgeschwemmt werden. Spontanagglutinationen in physiologischer NaCl-Lösung zeigten hiervon die Stämme Nr. 7, 99, 191, 252, 258, 623, 748.

In reiner R-Form wuchsen und ließen sich nicht homogen aufschwemmen die Stämme Nr. 3, 5, 12, 27, 32, 56.

Alle Stämme, die mit physiologischer NaCl-Lösung spontan agglutinierten, konnten zu den weiteren Agglutinationstesten mit Blut und Serum nicht mehr verwendet werden und wurden deshalb ausgeschieden.

Während der Versuche wurden die Antigene im Kühlschrank bei + 4° C aufbewahrt.

Agglutinationsvermögen mit Blut und Serum: Aus Tabelle 1 geht hervor, daß die Stämme Nr. 1, 10, 235 und 10/60 bei tuberkulösen Hühnern am besten reagierten. Eindeutige Reaktionen traten sowohl mit Citratblut als auch mit Serum auf. Die Reaktionen variierten von grobflockiger bis körniger Beschaffenheit und traten im allgemeinen nach 5 - 20 Sekunden, bei Stamm Nr. 1 jedoch spontan ein. Mit Blut und Serum nicht tuberkulöser Hühner ist es bei diesen Stämmen nicht zu einer Agglutination gekommen.

Die Stämme Nr. 4, 7, 8, 9, 131, 191, 211, 234, 258, 273 und 301 reagierten nicht mit Blut und Serum aller tuberkulösen Hühner. Auffallend war, daß diese Antigene gemeinsam an Blut und Serum des gleichen tuberkulösen Huhnes versagten. Es ist möglich, daß diese Erscheinung auf einen Antigenunterschied der Geflügeltuberkelbakterien zurückzuführen ist.

Mit Serum des tuberkulös infizierten Kaninchens (Av. 10/60) agglutinierten die Stämme Nr. 1, 8, 10, 235, mit Blut nur die Stämme Nr. 235 und 10/60.

b) Das Verhalten der auf "Petragnani mit Glycerin" gezüchteten Stämme

Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in Tabelle 2 zusammengestellt worden.

Wuchsform: Die Kulturen wuchsen langsamer als auf "Löwenstein-Jensen-Nährboden". Erst nach ungefähr 8 - 10 Tagen konnte deutliches Wachstum

festgestellt werden. Im allgemeinen waren die Bakterienrasen trockener, zäher, kompakter und nicht so schmierig wie auf "Löwenstein-Jensen-Nährboden". Einen deutlichen Unterschied in der Wuchsform zeigten gegenüber Züchtung auf "Löwenstein-Jensen-Nährboden" die Stämme Nr. 8, 273, 301. Der Stamm Nr. 8 war trockener, mit vielen halbkugeligen Erhebungen auf der gefurchten Oberfläche. Das typische, trockene Wachstum der R-Form zeigten die Stämme Nr. 273 und 301.

Suspendierung: Am besten ließen sich wiederum Bakterienstämme der reinen S-Form aufschwemmen (Nr. 1, 10, 131, 211, 235). Alle übrigen in S-Form oder in Übergangsform wachsenden Stämme zeigten nach Zugabe von physiologischer NaCl -Lösung Spontanagglutinationen, die gegenüber der Züchtung auf Löwenstein-Jensen bei den Stämmen Nr. 7, 99, 191, 258, 301 wesentlich verstärkt und bei Nr. 4, 9, 234, 273, 10/60 völlig neu auftraten.

In reiner R-Form wuchsen und ließen sich nicht aufschwemmen die Stämme Nr. 3, 5, 12, 27, 32, 56, 273, 301. Ebenfalls keine Aufschwemmung war möglich bei Stamm Nr. 8, der in Übergangsform wuchs.

Agglutinationsvermögen mit Blut und Serum: Aus Tabelle 2 geht hervor, daß die Stämme Nr. 1, 10, 235 bei tuberkulösen Hühnern am besten reagierten. Eindeutige Reaktionen traten sowohl mit Citratblut als auch mit Serum auf. Mit Blut und Serum nicht tuberkulöser Hühner ist es bei diesen Stämmen nicht zu einer Agglutination gekommen. Die Stämme Nr. 4, 9, 131, 211 reagierten nicht mit Blut und Serum aller tuberkulösen Hühner. Auffallend war, daß diese Antigene wiederum gemeinsam an Blut und Serum des gleichen tuberkulösen Huhnes versagten.

Mit Serum des tuberkulös infizierten Kaninchens (Av. 10/60) agglutinierten die Stämme Nr. 1, 10, 235.

c) Das Verhalten der in "Besredka"-Medium gezüchteten Stämme

Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in Tabelle 3 zusammengestellt worden.

Wuchsform: Die Kulturen wuchsen am Boden der Röhrchen. Beim Schütteln bildete sich bei Stämmen der S-Form ein spiralenartiges, watteähnliches Gebilde, das schließlich eine gleichmäßige homogene Trübung erzeugte.

Tabelle 3: Wuchsform und antigenes Verhalten der auf "Besredka"-Medium gezüchteten Geflügeltuberkelbakterien

Stamm-Nr.	Wuchsform	Agglutinationen mit: Physiol. NaCl Lösung	Normalblut 2 ges. Hühner	Normalserum 2 ges. Hühner	Normalblut Kaninchen	Tuberkulöses Kaninchen Blut	Tuberkulöses Kaninchen Serum	Blut und Serum tuberkulöser Hühner Nr. 1 Blut	Nr. 1 Serum	Nr. 2 Blut	Nr. 2 Serum	Nr. 3 Blut	Nr. 3 Serum	Nr. 4 Blut	Nr. 4 Serum	Nr. 6 Blut	Nr. 6 Serum
1	S	-	-	-	-	-	-	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
3	R	++++	nicht weiter untersucht														
4	S	+++	nicht weiter untersucht														
5	R	++++	nicht weiter untersucht														
7	R	++++	nicht weiter untersucht														
8	R	+++	nicht weiter untersucht														
9	S	-	-	-	-	-	-	++++	+++	++++	-	++++	++++	++++	-	++++	++++
10	S	-	-	-	-	-	-	++++	++++	++++	+++	++++	++++	++++	+++	++++	++++
12	R	++++	nicht weiter untersucht														
27	R	++++	nicht weiter untersucht														
32	R	++++	nicht weiter untersucht														
56	R	++++	nicht weiter untersucht														
99	R-S	++++	nicht weiter untersucht														
131	S	-	-	-	-	-	-	++++	+	++++	+	++++	++++	++++	-	++++	++
191	S-R	+++	nicht weiter untersucht														
211	S	-	-	-	-	-	-	++++	++	++++	++	++++	++	++++	-	++++	+
234	R-S	++++	nicht weiter untersucht														
235	S	-	-	-	-	-	-	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
252	R	++++	nicht weiter untersucht														
258	R-S	++++	nicht weiter untersucht														
273	S	++++	nicht weiter untersucht														
301	R-S	++++	nicht weiter untersucht														
623	S	++++	nicht weiter untersucht														
748	R	++++	nicht weiter untersucht														
10/60	S	++++	nicht weiter untersucht														

Bei Stämmen der R-Form konnte durch Schütteln keine Trübung erzeugt werden. Sie lösten sich vielmehr in krümeligen, kompakten Massen.

Es zeigte sich bei den Kulturen Nr. 3, 252, 748, die bisher eine Zwischenstellung eingenommen hatten, eindeutig, daß sie in der R-Form wachsen. Zum ersten Mal in der R-Form wuchs der Stamm Nr. 7, dagegen gehörte Stamm Nr. 273 der S-Form an.

Suspendierung: Am besten ließen sich wiederum die Stämme der reinen S-Form aufschwemmen (Nr. 1, 9, 10, 131, 211, 235).

Spontanagglutinationen nach Zugabe von physiologischer NaCl-Lösung zeigten die Stämme Nr. 4, 8, 99, 191, 234, 258, 273, 301, 623, 10/60.

In der reinen R-Form wuchsen und ließen sich nicht aufschwemmen die Stämme Nr. 3, 5, 7, 12, 27, 32, 56, 252, 748.

Agglutinationsvermögen mit Blut und Serum: Aus Tabelle 3 geht hervor, daß die Stämme Nr. 1, 10, 235 am besten bei tuberkulösen Hühnern reagierten. Eindeutige Reaktionen traten sowohl mit Citratblut als auch mit Serum auf. Mit Blut und Serum nicht tuberkulöser Hühner ist es bei diesen Stämmen nicht zu einer Agglutination gekommen. Die Stämme Nr. 9, 131, 191 reagierten nicht mit dem Serum aller tuberkulösen Hühner.

d) Das Verhalten der in "Glycerin-Bouillon" gezüchteten Stämme

Wuchsform: Die Kulturen der S-Form wuchsen am Grunde des Röhrchens in Form eines Bodensatzes, der durch Schütteln eine homogene Färbung verursachte.

Die Stämme der R-Form wuchsen an der Oberfläche des Flüssigkeitsspiegels in weißen, blumenkohlartigen, krümeligen Massen, die durch Schütteln keine Trübung hervorriefen. In einer reinen S-Form wuchsen die Stämme Nr. 1, 4, 234, 235, 258, 273, 301 und 10/60.

Zwischenstellungen nahmen die Kulturen Nr. 9, 131, 211, 252 ein, davon Nr. 131 zum ersten Mal.

In der reinen R-Form wuchsen die Stämme Nr. 3, 5, 7, 8, 10, 12, 27, 32, 56, 99, 623, 748. Zum ersten Mal traten davon die Stämme Nr. 10 und 623 in der R-Form, in der reinen R-Form die Stämme 8 und 99 auf.

Suspendierung: Sämtliche Stämme, die nicht der R-Form angehörten, und sich deshalb von vornherein nicht suspendieren ließen, zeigten bei den Aufschwemmungen mit physiologischer NaCl-Lösung Spontanagglutinationen und konnten deshalb zu keinen weiteren Versuchen mehr verwendet werden.

e) Das Verhalten der auf "Sauton-Medium" gezüchteten Stämme

Alle Kulturen wuchsen in Form einer Diskusscheibe am Grunde der Röhrchen. Die Kulturmassen ließen sich nicht homogen aufschütteln. Eine besondere Form des Wachstums zu bestimmen war nicht möglich. Auch die Zerreibung der Bakterienmassen scheiterte an den zusammenhängenden, gummiartigen Kolonien der Stämme.

f) Das Verhalten der auf "Hohn-Gottsacker" Nährboden gezüchteten Stämme

Wuchsform: Die Kulturen wuchsen rascher und üppiger als auf den beiden anderen festen Substraten. Die Keime konnten bereits nach 3wöchiger Bebrütung bei 37° C als schmierige, sehr weiche, leicht zerreibbare, homogene Masse entnommen oder durch vorsichtiges Schütteln abgeschwemmt werden. In reiner S-Form wuchsen die Stämme Nr. 1, 4, 7, 9, 10, 131, 211, 235. Stämme der reinen R-Form (Nr. 3, 5, 12, 27, 32, 56) sowie Stämme der Übergangsformen (Nr. 8, 99, 252, 273, 301) behielten ihre auf den beiden vorhergehenden Substraten gezeigte Wuchsform bei.

Suspendierung: Am besten ließen sich wiederum die Stämme der reinen S-Form aufschwemmen (Nr. 1, 10, 131, 211, 235). Eine Aufschwemmung war schon durch bloßes Schütteln mit der Hand, ohne Zuhilfenahme eines Glasstabes möglich. Stämme, die in der R-Form wuchsen, ließen sich nicht aufschwemmen. Alle übrigen Stämme zeigten nach Zugabe von physiologischer NaCl-Lösung Spontanagglutinationen.

Agglutinationsvermögen mit Blut und Serum: Die Stämme Nr. 1, 10, 235 agglutinierten bei tuberkulösen Hühnern am besten. Eindeutige Reaktionen traten sowohl mit Citratblut als auch mit Serum auf. Mit Blut und Serum nicht tuberkulöser Hühner ist es bei diesen Stämmen zu keiner Agglutination gekommen.

Die Stämme Nr. 131 und 211 reagierten nicht mit Blut und Serum aller tuberkulösen Hühner.

g) Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Züchtung von Bakterienkulturen auf verschiedenen Nährmedien eignet sich dazu, zur Antigenherstellung brauchbare Stämme herauszufinden. Die Bakterien wuchsen am besten auf "Löwenstein-Jensen" und "Hohn-Gottsacker" Nährböden. Bei Züchtung auf glycerinhaltigeren Nährmedien wurde eine Verschiebung des Wachstums von "S" nach "R", erschwerte Suspendierbarkeit sowie erhöhtes Auftreten von Spontanagglutinationen nach Zugabe von physiologischer NaCl-Lösung beobachtet.

Kulturen, die auf "Glycerin-Bouillon" und "Sauton-Medium" gezüchtet worden waren, konnten nicht mehr stabil und homogen aufgeschwemmt werden.

Am besten ließen sich die Stämme der reinen S-Form aufschwemmen. Schon nach 2 bis 3 Minuten wurde durch eine Zerreibung mit dem Glasstab eine milchige, homogene Suspension erreicht.

Stämme, die in der R-Form wuchsen, ließen sich nicht, solche der Übergangsformen (S R) nur sehr schwer, durch 10minütiges intensives Zerreiben mit dem Glasstab aufschwemmen.

Nur 3 der untersuchten Stämme (Nr. 1, 10 und 235) wiesen sich durch Stabilität, gutes Agglutinationsvermögen mit Blut und Serum aller tuberkulösen Hühner sowie Spezifität durch das Fehlen von Reaktionen bei Blut und Serum gesunder Hühner aus. Die Agglutinationen variierten von grobflockiger bis körniger Beschaffenheit und traten im allgemeinen nach 5 - 20 Sekunden ein.

Eine Reihe von Stämmen reagierte nicht mit Blut und Serum aller tuberkulösen Hühner. Auffallend war, daß diese Antigene gemeinsam an Blut und Serum des gleichen tuberkulösen Huhnes versagten. Es ist möglich, daß diese Erscheinung auf einen Antigenunterschied zurückzuführen ist.

2.) Herstellung einer für die Praxis verwendbaren Suspension

a) Abtötung durch Erhitzen

Da es für die praktische Anwendung zweckmäßig ist, ein Antigen aus abgetöteten Keimen zu benützen, wurde geprüft, unter welchen Bedingungen sich eine Abtötung der Keime am besten bewerkstelligen ließ.

Um eine Abtötung von Bakterien zu erreichen, wurden die Aufschwemmungen im Wasserbad erhitzt. Die Temperaturen betrugen 60^{o} C bei 4 Stunden Dauer,

70° C bei 2 Stunden Dauer und 80° C bei 1/2 Stunde Dauer. Dabei zeigte sich, daß schon nach 10 Minuten Erhitzen Verklumpungen der Bakterien eintraten, deren Intensität von der Höhe der Temperatur abhing.

Es zeigten sich auch deutliche antigene Unterschiede der einzelnen Stämme.

Am stärksten durch die Erhitzung beeinträchtigt wurde der Stamm Nr. 10. Bei 80° C war die Ausflockung so stark (++++), daß die Aufschwemmung nur noch schwach milchig erschien. Eine deutliche, starke, gleichmäßige, noch milchige Ausfällung zeigte sich bei einer Temperatur von 70° C und bei 60° C konnte man eine gerade noch erkennbare (++) Ausflockung feststellen.

Der Stamm Nr. 235 reagierte zwar weniger stark, doch zeigten sich bei einer Temperatur von 80° C mittelgradige (++) Ausflockungen, die gut erkennbar waren und sich bei den niedrigen Temperaturen etwas abschwächten. Das günstigste Verhalten zeigte Stamm Nr. 1. Obwohl auch diese Suspension Verklumpungen zeigte, die zwar bei 80° C deutlich (++), bei 70° C schwächer und bei 60° C nicht mehr genau (+) erkennbar waren, so verblieb die Aufschwemmung doch im ganzen gesehen homogen und von milchigem Aussehen.

Überimpfungen der erhitzten Aufschwemmungen auf je zwei Röhrchen "Petragnani ohne Glycerin" und "Löwenstein-Jensen" ergaben nach 3 Wochen Bebrütung bei 37° C, daß die Bakterien bei allen drei Temperaturstufen vollständig abgetötet worden waren.

Eine Abtötung war zwar erreicht, doch ließen sich die Antigene wegen der aufgetretenen Verklumpungen, die leicht eine Agglutination vortäuschen konnten, doch nicht mehr in befriedigender Weise zur Frischblutschnellagglutination verwenden.

Das zeigen die folgenden Untersuchungen, in denen das Agglutinationsvermögen eines erhitzten Antigens an Blut und Serum tuberkulöser und tuberkulosefreier Hühner geprüft wurde (Tabelle 4).

Tabelle 4: Vergleichende Frischblut-Schnellagglutinationen mit unerhitztem sowie auf 60° C erhitztem Antigen Nr. 1

	Agglutinationen mit Blut								
Antigen	gesunder		tuberkulöser Hühner					Kaninchen	
Nr. 1	Hühner		Nr. 1	Nr. 2	Nr. 3	Nr. 4	Nr. 6	gesund	tuberkul.
erhitzt	++	+++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++++
unerhitzt	-	-	++++	++++	++++	++++	++++	-	+++

Tabelle 5: Langsamagglutinationen mit Seren gesunder und tuberkulöser Tiere zur Prüfung des Agglutinationsvermögens vom erhitzten und unerhitzten Antigen Nr. 1 (abgelesen nach 1/2 Stunde)
a = unerhitzt
b = erhitzt

Verdünnungen von	Langsamagglutinationen mit: Normal Serum v. gesund. Huhn		Normal Serum v. gesund. Huhn		Normal Serum v. gesund. Kaninchen		Tuberkulöses Serum von Kaninchen		Seren tuberkulöser Hühner: Nr. 1		Nr. 2		Nr. 3		Nr. 4		Nr. 5	
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
1 : 10	-	-	-	-	-	++	-	++	-	-	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
1 : 20	-	-	-	-	-	++	-	++	-	-	+++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
1 : 40	-	-	-	-	-	++	-	++	-	-	+++	++	++	+	++	++	+++	+++
1 : 80	-	-	-	-	-	++	-	++	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+++
1 : 160	-	-	-	-	-	++	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++
1 : 320	-	-	-	-	-	++	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++
1 : 640	-	-	-	-	-	++	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++
1 : 1280	-	-	-	-	-	++	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++

Tabelle 6: Langsamagglutinationen mit Seren gesunder und tuberkulöser Tiere zur Prüfung des Agglutinationsvermögens vom erhitzten und unerhitzten Antigen Nr. 1 (abgelesen nach 12 Stunden)

a = unerhitzt
b = erhitzt

Verdünnungen von	Langsamagglutinationen mit																	
	Normal Serum v. gesund. Huhn		Normal Serum v. gesund. Huhn		Normal Serum v. gesund. Kaninchen		Tuberkulöses Serum von Kaninchen		Seren tuberkulöser Hühner									
									Nr. 1		Nr. 2		Nr. 3		Nr. 4		Nr. 5	
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
1 : 10	-	++	-	+++	-	+++	-	+++	+++	+++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
1 : 20	-	++	-	++	-	+++	-	+++	++	++	+++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
1 : 40	-	++	-	++	-	+++	-	+++	++	++	+++	++++	+++	+++	+++	++++	++++	++++
1 : 80	-	++	-	++	-	+++	+	+++	+	++	++	+++	++	+++	++	+++	+++	++++
1 : 160	-	++	-	++	-	+++	-	++	+	++	++	+++	++	+++	++	++++	-	++++
1 : 320	-	++	-	++	-	+++	-	++	+	++	++	+++	+	+++	++	++++	-	++++
1 : 640	-	+	-	++	-	+++	-	++	+	++	+	++++	+	+++	++	++++	-	++++
1 : 1280	-	+	-	++	-	+++	-	++	+	++	+	++++	+	+++	++	++++	-	++++

Die in Tabelle 4 aufgezeichneten Agglutinationen traten nach 10 - 20 Sekunden ein. Bei dem erhitzten Antigen dauerte es etwas länger. Große Schwierigkeiten ergaben sich mit dem erhitzten Antigen bei der Beurteilung der negativen Reaktionen. Es zeigte sich jedoch, daß die Agglutinationsfähigkeit durch das Erhitzen nicht verloren gegangen war.

Eine Bestätigung dieses Ergebnisses wurde auch durch eine Langsamagglutination erreicht, mit der gleichzeitig Unterschiede in der Antikörperstruktur der verschiedenen Tiere festgestellt werden sollten. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 und 6 zusammengestellt worden.

Den Serumverdünnungen von 1 ccm wurde je ein Tropfen unerhitztes, bzw. bei 60° C erhitztes Antigen des Stammes Nr. 1, der auf "Löwenstein-Jensen" bei 37° C 21 Tage gezüchtet worden war, beigegeben.

Abgelesen wurden die Agglutinationen mit Hilfe eines mikroskopischen Hohlspiegels.

Aus Tabelle 5 ergibt sich, daß bei den gesunden Hühnern sowie bei den Kaninchen die Reihe "a" (unerhitztes Antigen) durchweg negativ verlief, sich bei der Reihe "b" (erhitztes Antigen) der Kaninchen jedoch Reaktionen zeigten, die mit einer konstanten Stärke von (++) verliefen.

Von den tuberkulösen Hühnern zeigte keinerlei Reaktion das Serum Nr. 1. Alle anderen tuberkulösen Hühner zeigten bis zu einer Verdünnung von 1:20 deutliche Agglutinationen. Aus Tabelle 6 ergibt sich, daß sowohl bei allen gesunden Hühnern als auch bei den Kaninchen die Reihe "a" (unerhitztes Antigen) durchweg negativ verlief, sich in Reihe "b" (erhitztes Antigen) jedoch deutliche Reaktionen zeigten, die ziemlich konstant verliefen.

Alle Seren der tuberkulösen Hühner zeigten deutliche Reaktionen; der späte Eintritt der Agglutination bei Serum Nr. 1 dürfte auf serumspezifische Eigenschaften zurückzuführen sein.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die Reaktionen der Reihe "b" (erhitztes Antigen) weniger als echte Agglutinationen, sondern vielmehr als Verklumpungen der Bakterien infolge Antigenschädigung durch Erhitzen anzusprechen sind. Die deutlichen Agglutinationen der positiven Seren, die schon nach 1/2 Stunde eintraten, zeigen, daß das Antigen trotz der Erhitzung seine Agglutinationsfähigkeit erhalten hat.

b) Homogenisierung durch Glasperlen

Die durch das Erhitzen entstandenen Verklumpungen der Bakterien machten das Antigen für eine genaue und sichere Diagnosestellung unbrauchbar. Um trotzdem noch eine Verwendung zu erreichen, wurde versucht, die Bakterienaufschwemmung mit ihren Ausflockungen durch Schütteln mit Glasperlen zu homogenisieren.

Methodik:
Bei den wiederholt vorgenommenen Versuchen wurden die bei 37° C, 21 Tage auf "Löwenstein-Jensen" gezüchteten und bei 60° C, 70° C und 80° C abgetöteten Bakterienaufschwemmungen jeweils so in einen Erlenmeyerkolben gegeben, daß die Flüssigkeit die Glasperlenoberfläche bedeckte. Sodann wurden die Suspensionen mit dem Schüttelapparat bei niedrigster Umdrehungszahl mit wechselnder Dauer geschüttelt.

Ergebnis:
Durch das Schütteln mit Glasperlen ließ sich zwar eine gewisse Homogenisierung der durch das Erhitzen entstandenen Verklumpungen erreichen - selbst bei einer Stärke von (++++), wie dies bei Stamm Nr. 10 der Fall war - jedoch bewirkte die verstärkte mechanische Behandlung noch eine zusätzliche Ausfällung. Sie unterschied sich von der vorhergehenden, durch die Erhitzung bedingten dadurch, daß sie allerfeinste, griesartige Beschaffenheit besaß. Dieser Effekt stellte sich bei allen drei Stämmen ein, unabhängig von der Temperaturhöhe des erhitzten Antigens.

Die geringste Ausfällung trat bei Stamm Nr. 1 auf. Die zusätzliche Ausflockung des Antigens war schon nach 1/2 Stunde feststellbar und verstärkte sich mit der Dauer des Schüttelns. Eine vollständige Homogenisierung der groben, durch die Erhitzung verursachten Bakterienklumpen, die etwa 12 Stunden ziemlich stabil blieb, war erst nach 2 Stunden Schütteldauer zu erreichen.

Mit der Behandlung durch Glasperlen war auch ein Flüssigkeitsverlust von etwa 1/3 der ursprünglichen Menge verbunden, der durch die Adhäsion der Glasperlenoberfläche sowie durch die bei dem Verfahren entstandene größere Oberfläche der Bakterien erklärt werden kann.

Durch das Schütteln mit Glasperlen war wohl eine Homogenisierung der Bakterien erreicht, doch ließ sich das Antigen wegen der zusätzlichen Ausfällung wiederum nicht als Testflüssigkeit verwenden. In den folgenden Untersuchun-

gen wurde deshalb versucht, die Keimsuspensionen mit verschiedenen Methoden von den groben Ausfällungen zu befreien.

c) Der Einfluß des Sedimentierens und Zentrifugierens auf die Homogenität der Keimsuspension

Eine Ausscheidung der Bakterienverklumpungen, die eine sichere Diagnose der Agglutinationen unmöglich machten, war auf zwei Arten zu erreichen:

1.) Durch längeres Stehenlassen. Nach 24 Stunden und mehr hatten sich die groben Bestandteile der Suspension am Boden abgesetzt. Durch Abgießen und nochmaliges Sedimentieren konnte so eine gute Trennung der groben und feinen Bestandteile erreicht werden.

2.) Durch Zentrifugieren. Schneller erreicht wurde die Sedimentation grober Partikel durch zweimaliges Zentrifugieren bei etwa 1 000 U/Min. von 1 Minute Dauer. Bei beiden Verfahren kam es aber später wieder zu einer spontanen Ausflockung, die zu einer weiteren Sedimentierung von Bakterienklumpen führte.

Wie Versuche zeigten, traten bei der Beurteilung von Agglutinationsreaktionen auch erneut Schwierigkeiten auf. Durch das spontane Sedimentieren oder das Zentrifugieren wurde verständlicherweise auch die Bakterienkonzentration immer geringer. Das wiederum war mit einer Verlangsamung der Agglutination verbunden. In Einzelfällen erfolgte auch eine so deutliche Abschwächung positiver Agglutinationen, daß sie nur noch als fraglich beurteilt werden konnten. Das galt vor allem für Reaktionen mit Frischblut. Mit Serum wurden bessere Resultate erzielt. Die Sedimentierung war bei dem Stamm Nr. 10 am stärksten, bei Nr. 1 am schwächsten. Stamm Nr. 235 nahm eine Mittelstellung ein.

d) Der Einfluß von Tween 80 auf die Homogenität der Keimsuspension

Als weitere Methode, homogene Aufschwemmungen zu erreichen, wurde als oberflächenentspannendes Mittel Tween 80 angewandt.

Tween 80 wurde mit einer Haarpipette in Konzentrationen von 1 %, 5 %, 10 % in Tropfen zu jeweils 0,5 ccm erhitzte Bakterienaufschwemmung der Stämme Nr. 1 (Petragnani mit Glycerin), Nr. 10 (Petragnani mit Glycerin), Nr. 10 (Löwenstein-Jensen), Nr. 235 (Petragnani mit Glycerin), Nr. 235 (Lö-

wenstein-Jensen) und dem in der R-Form wachsenden Stamm Nr. 3 beigegeben. Dabei zeigte sich zwar bei allen Stämmen eine Lösung und Verfeinerung der Verklumpungen, jedoch keine völlige Aufhebung derselben.

e) Der Einfluß der Züchtungsbedingungen auf die Homogenität der Keimsuspension

Völlig unbekannt war der Einfluß der Züchtungsbedingungen auf das Verhalten der einzelnen Stämme. Die folgenden Darlegungen sollten einen Einblick in die Frage vermitteln, welchen Einfluß die Züchtungsbedingungen auf die Homogenisierbarkeit der Stämme besitzen.

Methodik: Die Stämme Nr. 1, 10 und 235 wurden bei 30° C und 37° C auf "Petragnani ohne Glycerin" und "Löwenstein-Jensen" gezüchtet. Alle 7 Tage wurden Kontrollsuspensionen hergestellt. Die Schlierenbildung und die Schwierigkeit bei der Zerreibung mit dem Glasstab wurden dabei in 4 Graden (+ bis ++++) ausgedrückt.

Aus Tabelle 7 ergibt sich, daß nach 7 Tagen eine Suspensionsherstellung sehr schwierig war. Das Bakterienmaterial hing gummiartig, klebrig, zäh aneinander. Dies galt besonders für die bei 30° C gezüchteten Stämme, von denen sich Stamm Nr. 235 überhaupt nicht aufschwemmen ließ.

Nach 14 Tagen lassen sich nach wie vor alle bei 30° C gezüchteten Kulturen nur sehr schlecht aufschwemmen und zerreiben. Es bilden sich bei allen Suspensionen Schlieren. Am besten lassen sich noch die bei 37° C auf "Löwenstein-Jensen" gezüchteten Kulturen aufschwemmen.

Auch nach 21 bzw. 30tägiger Bebrütung lassen sich die bei 30° C gezüchteten Kulturen wegen ihrer klebrigen Konsistenz kaum zerreiben. Die bei 37° C bebrüteten Kulturen konnten dagegen, vor allem nach 30tägigem Aufenthalt im Brutschrank, relativ gut homogenisiert werden. Besonders gut zerreiben ließ sich Stamm Nr. 1.

Ergebnisse:

Tabelle 7: Schwierigkeitsgrad der Homogenisierbarkeit in Abhängigkeit von Nährboden und Bebrütungstemperatur

Stamm Nr.	Kultur auf Löwenstein-Jensen bei 30° C	bei 37° C	Kultur auf Petragnani bei 30° C	bei 37° C	Dauer der Bebrütung
1	+++	++	++++	+++	nach 7 Tg.
10	+++	+++	+++	++++	
235	++++	+++	++++	++++	
1	++	+++	++++	+++	nach 14 Tg.
10	+++	++	+++	+++	
235	++++	++	++++	++	
1	+++	+	+++	++	nach 21 Tg.
10	++++	+++	++++	+++	
235	++++	++	++++	++	
1	+++	+	+++	+	nach 30 Tg.
10	++++	++	++++	+++	
235	++++	++	++++	++	

f) Inaktivierung durch Formalin

Da in den vorausgegangenen Untersuchungen zur Abtötung der Geflügeltuberkelbakterien die Erhitzung eine unerwünschte Ausflockung der Antigene ergeben hatte, wurde geprüft, wie sich ein Formalinzusatz verhielt. Es konnte erwartet werden, daß durch Formalin nicht nur eine Abtötung der Keime erfolgte, sondern auch eine Steigerung der Haltbarkeit zustande käme.

Versuche mit Formaldehydkonzentrationen von 1 bis 40 % hatten das interessante Ergebnis, daß der Stamm Nr. 1 bei einer Formaldehydkonzentration von 40 % (!) seine Homogenität beibehielt. Dagegen agglutinierten Stamm Nr. 10 in einer 4 %igen und Stamm Nr. 235 in einer 5 %igen Formaldehydlösung.

Die Zugabe einer 1 %igen Formaldehydlösung hatte keine negativen Auswirkungen auf die Aufschwemmung. Die Aufschwemmungen mit 1 %igem Formal-

dehyd besaßen eine gute Homogenisierung. Die 3 Antigene sedimentierten innerhalb 24 Stunden weniger als nach Zusatz von Phenol (0,5 %). Nach Aufschütteln des formalinisierten Bodensatzes ließen sich keine Veränderungen in der Homogenität feststellen. Auch Erhitzen auf 80° C sowie 2stündiges Schütteln mit Glasperlen ergaben im Vergleich mit Phenolzusatz, daß sich die formalinisierten Suspensionen stabiler verhielten.

Zur Prüfung der Frage, nach welcher Zeit die Geflügeltuberkelbakterien durch eine 1 %ige Formaldehydlösung abgetötet werden, wurde nach 24 und 48 Stunden eine Überimpfung von Material auf je zwei Röhrchen "Löwenstein-Jensen" vorgenommen, die dann 30 Tage lang bei 37° C bebrütet wurden.

Während nach 24stündiger Einwirkung der 1 %igen Formaldehydlösung noch vermehrungsfähige Keime festgestellt werden konnten, blieb in den nach 48stündiger Einwirkung entnommenen Proben jegliches Wachstum aus.

Die Agglutinationsfähigkeit der mit 1 % Formaldehyd hergestellten Keimsuspensionen wurde nach Ablauf von 4 Tagen mit 3,8 %igem Zitratblut, sowie mit Frischblut an tuberkulösen und nichttuberkulösen Hühnern der Gruppe 1 getestet. Dabei kam es bei den tuberkulösen Hühnern zu eindeutigen und sofort eintretenden Agglutinationen. Bei tuberkulosefreien Hühnern blieben die Agglutinationen aus.

g) Haltbarkeit und Aufbewahrung des Antigens

Die Antigene wurden normalerweise im Kühlschrank bei +4° C aufbewahrt. Kontrollen in Abständen von 8 Tagen ließen bei Antigen Nr. 1 (1 % Formaldehyd) nach 2 Monaten keine Veränderungen in der Homogenität und der Agglutinationsfähigkeit mit positiven Hühnerseren erkennen. Antigene mit 0,5 %igem Phenolzusatz, mit oder ohne Glasperlenbehandlung, erhitzt oder unerhitzt, agglutinierten noch nach 6 Monaten Aufbewahrung im Kühlschrank, mit positiven Seren der Hühner aus Gruppe 2.

Ein Unterschied zwischen den 3 stabilen Stämmen Nr. 1, 10 und 235 konnte dabei nicht festgestellt werden. Auch durch eine 3monatige Aufbewahrung bei Zimmertemperatur veränderte sich die Aufschwemmung nicht und sie agglutinierte ebenfalls mit den entsprechenden positiven Seren.

Ein durch Abgießen des Überstandes und Verdunsten der Flüssigkeit in Pulverform hergestelltes Trockenantigen vermochte nach Aufschwemmung in

physiologischer Kochsalzlösung (Zusatz von 0,5 % Phenol) und 0,4 % Natriumzitrat) mit positiven Hühnerseren zu agglutinieren. Der Vorgang konnte sogar öfters wiederholt werden.

Dagegen trat nach Gefrieren in der Tiefkühltruhe und nachfolgendem Auftauen nach 12 Stunden eine Auto-Agglutination ein, welche die praktische Verwendung des Antigens zur Agglutination unmöglich machte.

D. Hauptversuche:

Während die bisherigen Versuche dazu dienten, stabile Stämme zu finden und diese im Labor auf ihre prinzipiellen antigenen Eigenschaften zu testen, galt es nun, die gefundenen Ergebnisse unter praktischen Verhältnissen in der "Frischblut-Schnellagglutination" zu prüfen.

Zu den Versuchsreihen 1 - 6 wurden Kulturen verwendet, die 3 Wochen bei 37° C auf "Hohn-Gottsacker"-Nährboden gezüchtet, mit physiologischer Kochsalzlösung (0,5 % Phenol, 0,4 % Natriumzitrat, pH = 7) versetzt und bei 60° C abgetötet worden waren. Nach 2stündigem Schütteln mit Glasperlen wurden die Aufschwemmungen 2mal bei 1 000 U/Min. 1 Minute lang zentrifugiert (Stamm Nr. 1_{I}).

Zum Vergleich wurden Aufschwemmungen verwendet, die nicht erhitzt worden waren (Stamm Nr. 1_{II}) und solche, die nicht erhitzt und denen kein Phenol beigegeben war (Stamm Nr. 1_{III}).

1. Versuchsreihe: Die Agglutinationen wurden mit Blut tuberkulöser Hühner, gesunder Hühner und je eines tuberkulösen und gesunden Kaninchens vorgenommen.

Tabelle 8: Vergleichende Agglutinationsversuche mit nicht erhitztem, erhitztem und keinen Phenolzusatz enthaltendem Antigen.

Antigen (Stamm Nr. 1)	Gesunde Tiere					Tuberkulöse Tiere			
	Huhn Nr. 7	Huhn Nr. 8	Huhn Nr. 11	Kaninchen norm.	Kaninchen Tbc.	Huhn Nr. 2	Huhn Nr. 3	Huhn Nr. 4	Huhn Nr. 6
1_I (erhitzt)	-	-	-	-	-	++++ 2 Min.	+++ 1 M.	++++ 30 M.	++++
1_{II} (nicht erhitzt)	-	-	-	-	-	++++ 10 M.	++++ 10 M.	++++ spontan	+++
1_{III} (ohne Phenolzusatz, nicht erhitzt	-	-	-	-	-	++++ 10 M.	++++ 10 M.	++++ grob	++++

Aus Tabelle 8 ist ersichtlich, daß zwischen den einzelnen Antigenen kein großer Unterschied bestand, was die Stärke der Reaktionen betrifft. Die Agglutinationen traten aber bei dem erhitzten Antigen, das durch die Sedimentierung eine Konzentration von etwa 5 % (unerhitztes 10 %) besaß, langsamer ein als bei den stärker konzentrierten.

Die Art der Agglutinate war nicht in allen Fällen gleich. Bei Huhn Nr. 4 waren die Agglutinationen grob, flockig und sie traten spontan ein. Bei den anderen Hühnern waren die Reaktionen feinkörniger, und sie waren in der Regel erst nach ca. 10 Sekunden deutlich sichtbar. Ein genereller Unterschied im Agglutinationsvermögen von erhitzten und unerhitzten Antigenen war bei der "Frischblut-Schnellagglutination" nicht festzustellen.

2. Versuchsreihe: Die Frischblut-Agglutination wurde mit den Antigenen Nr. 1_I, Nr. 1_{II} und Nr. 1_{III} an Hühnern aus drei verschiedenen Beständen durchgeführt. Zwei Tage vor Durchführung der Agglutination sind die Tiere mit Geflügeltuberkulin (0, 1 ccm) intrakutan in den Kehllappen tuberkulinisiert worden.

Versuchsergebnisse:

Bestand 1: 12 Hühner im Alter von 1 - 3 Jahren. Die Tuberkulinprobe fiel bei allen Tieren negativ aus. Die Frischblut-Agglutination hatte ebenfalls bei allen Tieren ein negatives Ergebnis.

Bestand 2: 23 Hühner im Alter von 1 - 2 Jahren. Tuberkulinprobe und Frischblut-Agglutination waren bei allen Tieren negativ.

Bestand 3: 67 Hühner im Alter von 7 Monaten bis 2 1/2 Jahren. Die Tuberkulinprobe fiel bei 15 Tieren positiv aus, mit z. T. starken Schwellungen an beiden Kehllappen.

Bei 35 Hühnern wurde die Agglutinationsprobe vorgenommen. 23 davon reagierten positiv. Die Ergebnisse sind in der folgenden Übersicht zusammengestellt:

Ausfall der Agglutination	Tuberkulinprobe negativ	Tuberkulinprobe positiv	Tuberkulinprobe stark positiv
fraglich	2	1	1
positiv	4	11	0
stark positiv	2	1	1
insgesamt:	8	13	2

Die Agglutinationen, die in der Regel eine feine, körnige Beschaffenheit aufwiesen, traten meistens erst nach 2 - 3 Minuten ein. Dabei trat die Reaktion bei dem erhitzten Antigen (Nr. 1_{I}) etwas später ein als bei den nicht erhitzten Antigenen (Nr. 1_{II} und Nr. 1_{III}). Wesentliche Unterschiede waren jedoch nicht festzustellen.

Bemerkenswert war, daß von 8 Hühnern, die auf die allergische Probe nicht reagiert hatten, auf die Agglutinationsprobe 2 Tiere ganz stark (++++), 4 Tiere stark (+++) und 2 Tiere fraglich (++) reagierten.

Andererseits verlief die Tuberkulinprobe bei 1 Tier positiv, während die Agglutinationsprobe nur einen fraglichen Befund (++) zeigte.

3. Versuchsreihe: 20 Hühnern der 2. Versuchsreihe, die positiv reagiert hatten, sowie die tuberkulinpositiven und -negativen Hühner der Gruppe 1 wurden einmal vor und nach einer intrakutanen Tuberkulinprobe und dann 4 Wo-

chen später erneut einer Agglutinationsprobe unterzogen.

Zur Anwendung gelangten Antigene der Stämme Nr. 1, 10 und 235, die auf "Hohn-Gottsacker"-Nährboden 21 Tage bei 37° C gezüchtet und mit einer 1 %igen Formaldehydlösung abgetötet und konserviert worden waren. Die Agglutinationen wurden mit Frischblut vorgenommen.

a) Die erste Agglutination erfolgte am 17. 12. 1960, sechs Wochen, nachdem die Tiere zum ersten Mal in dem infizierten Bestand (Versuchsreihe 2) als tuberkulös erkannt worden waren. Das Alter der Bakterienaufschwemmung betrug 4 Tage.

Die Hühner wurden unmittelbar nach der Blutentnahme im rechten Kehllappen mit 0, 1 ml Geflügeltuberkulin tuberkulinisiert.

Die 2. Agglutination erfolgte am 19. 12. 1960 nach Ablesen der Tuberkulin-Kehllappenprobe. Es wurden die gleichen Antigene verwendet.

Die Untersuchungsergebnisse sind in Tabelle 9 zusammengestellt worden.

Die in dieser Tabelle aufgezeichneten positiven Agglutinationsproben, die vor der Kehllappenprobe durchgeführt worden waren, hatten im allgemeinen eine feine, körnige Beschaffenheit. Sie traten bei Stamm Av 1 ungefähr nach 5 - 30 Sekunden, bei Stamm Av 10 nach 3 - 40 Sekunden, bei Stamm Av 235 nach 10 - 60 Sekunden ein. Spontan und besonders ausgeprägt von grobem, flockigem Charakter verliefen die Agglutinationen bei den Tieren Nr. 79, 80 und 2.

Zwei tuberkulosefreie Kontrolltiere (Nr. 7, 8) reagierten negativ.

Das Ergebnis der Tuberkulinprobe fiel bei 13 der 23 tuberkulinisierten Tiere stark positiv (mit deutlicher Schwellung eines Kehllappens) und bei 4 Tieren ebenfalls stark positiv (mit collateraler Schwellung beider Kehllappen) aus. 7 Hühner, die vor 6 Wochen positiv reagiert hatten, sowie die gesunden Kontroll-Hühner Nr. 7 und 8 zeigten diesmal keine Reaktion.

Im Vergleich zu der vor der Tuberkulinprobe durchgeführten Agglutination kam es bei der 48 Stunden später bei der Ablesung der Tuberkulinprobe vorgenommenen Blutuntersuchung zu auffallend schneller eintretenden und intensiver ausfallenden Agglutinationen. Die Ausflockungen traten stets innerhalb 2 - 5 Sekunden ein.

Tabelle 9: Der Ausfall der Frischblut-Agglutination vor und nach einer intrakutanen Kehllappenprobe mit Geflügeltuberkulin

Nr. der Fußmarke	Ergebnis der Frischblut-Agglutination vor der Tuberkulinprobe			48 Std. nach der Tuberkulinprobe			Ergebnis d. Tuberkulinprobe
	Av 1	Av 10	Av 235	Av 1	Av 10	Av 235	
66	30 ++++	+++	30 ++++	grob ++++	2 ++++	2 ++++	-
67	5 ++++	3 ++++	20 +++	2 ++++	2 ++++	2 ++++	-
68	5 ++++	10 ++++	30 +++	3 ++++	3 ++++	3 ++++	+
69	3 ++++	3 ++++	10 ++++	2 ++++	2 ++++	2 ++++	++
70	5 ++++	5 ++++	10 ++++	3 ++++	5 ++++	5 ++++	+
71	5 ++++	5 ++++	15 ++++	3 ++++	5 ++++	5 ++++	+
72	10 ++++	10 ++++	20 ++++	5 ++++	5 ++++	5 ++++	+
73	3 ++++	5 ++++	30 +++	2 ++++	2 ++++	2 ++++	+
74	70 ++	60 ++	60 ++	2 ++++	3 ++++	5 ++++	+
75	5 ++++	5 ++++	10 +++	2 ++++	2 ++++	2 ++++	++
76	30 ++++	40 ++++	40 ++++	4 ++++	5 ++++	5 ++++	-
77	30 ++++	40 ++++	60 ++++	2 ++++	2 ++++	2 ++++	+
78	5 ++++	5 ++++	8 ++++	4 ++++	4 ++++	4 ++++	+
79	3 ++++	3 ++++	5 ++++	1 ++++	1 ++++	1 ++++	+
80	2 ++++	3 ++++	5 ++++	2 ++++	5 ++++	5 ++++	++
81	5 ++++	5 ++++	10 ++++	1 ++++	2 ++++	3 ++++	+
82	10 ++++	10 ++++	20 ++++	3 ++++	3 ++++	3 ++++	+
83	20 ++++	60 ++++	60 ++++	2 ++++	2 ++++	2 ++++	+
84	3 ++++	4 ++++	5 ++++	3 ++++	3 ++++	3 ++++	++
85	5 ++++	10 ++++	15 ++++	3 ++++	3 ++++	3 ++++	-
2	2 ++++	3 ++++	5 ++++	2 ++++	2 ++++	2 ++++	+
3	2 ++++	3 ++++	5 ++++	2 ++++	2 ++++	2 ++++	-
4	5 ++++	10 ++++	20 ++++	2 ++++	2 ++++	2 ++++	-
7	-	-	-	-	-	-	-

Besonders stark, mit groben Flocken, im Gegensatz zu den feinen, körnigen Agglutinationen der anderen Tiere reagierten die Hühner Nr. 66 und Nr. 67 bei Stamm Nr. 1. Vermutlich ist diese Verstärkung der Agglutinationsreaktion darauf zurückzuführen, daß die Tuberkulinprobe bei den tuberkulösen Tieren, auch dann, wenn sie negativ ausfiel, die Bildung von agglutinierenden Antikörpern förderte.

b) 5 Tage nach der intrakutanen Injektion von Geflügeltuberkulin wurde am 22.12.1960 eine erneute Frischblut-Schnellagglutination durchgeführt. Verwendet wurden wieder die gleichen Antigene, die 9 Tage alt waren.

Aus Tabelle 10 (siehe nächste Seite) ersieht man, daß die Eintrittsdauer der Reaktionen im Vergleich zu den vor 3 Tagen am 19.12. erfolgten erheblich verlängert war. Die Agglutinationen waren dabei von feiner, körniger Beschaffenheit. Eine Ausnahme bildete nur das Blut, das spontan und grobflockig mit allen 3 Antigenen agglutinierte.

Bei der Beurteilung der Reaktionen wurde beobachtet, daß die normale Gerinnungszeit des Blutes tuberkulöser und kachektischer Tiere häufig erheblich verkürzt war. Das führte manchmal zu einer Erschwerung der Beurteilung der Agglutination, weil diese Gerinnung, die leicht eine Agglutination vortäuschen kann, oft vor Zugabe des Antigens bereits eintrat. Die Ablesung der Ergebnisse wurde dadurch erschwert. Zum Unterschied von echten Agglutinaten waren die Flocken der Blutgerinnung jedoch von glasiger Konsistenz und unregelmäßigem Aussehen. Agglutinate dagegen bestanden aus weißlichen, griesartigen Flocken oder Körnchen, die gleichmäßig und homogen verteilt waren.

Daß diese Veränderungen durch eine schwache Gerinnung und nicht durch eine Beeinflussung des Antigens bedingt waren, ergibt sich daraus, daß sie auch auftraten, wenn zum Blut anstelle des Antigens nur physiologische Kochsalzlösung mit 0,4 % bzw. 3,8 % Natriumzitratzusatz gegeben wurde (Tabelle 10, letzte Spalten).

c) Rund 4 Wochen nach den eben geschilderten Versuchen wurden am 24.1. 1961 erneut eine Frischblut-Agglutination und eine Tuberkulinprobe vorgenommen. Im Anschluß an die Beurteilung der Kehllappenprobe wurden die Tiere dann getötet und zerlegt.

Zur Agglutination wurden die nach dem gleichen Verfahren hergestellten Antigene der Stämme Av 1, Av 10 und Av 235 verwendet. Die Antigene

Tabelle 10: Der Ausfall einer Frischblut-Agglutination 5 Tage nach Durchführung einer intrakutanen Kehllappenprobe

Nr. der Fußmarke	Ergebnis der Frischblut-Agglutination mit Antigen Av 1	Av 10	Av 235	mit physiol. NaCl 0,4 % Na-citrat	physiol. NaCl 3,8 % Na-citrat
66	++++ 4 / ++++ 50	++++ 10 / ++++ 60	++++ 15 / ++++ 60	+	-
67	++++ 50	+++ 60	+++ 120	-	-
68	+++ 60	+++ 80	++ 80	++	-
69	+++ 2	+++ 2	+++ 2	++	++
70	+++ 3	+++ 5	+++ 15	-	-
71	+++ 20	+++ 60	+++ 60	++	++
72	+++ 10	++ 20	++ 20	+++	+++
73	++++ 40	++++ 40	++++ 60	+++	++
74	+++ 60	+++ 60	+++ 80	++	+
75	+++ 20	+++ 30	+++ 30	++	++
76	++++ 20	++++ 40	++++ 40	-	-
77	++++ 20	++++ 30	++++ 40	-	-
78	++++ 60	++++ 60	++++ 60	-	-
79	++++ 40	+++ 60	+++ 80	-	-
80	++++ 10	+++ 10	++++ 10	+++	++
81	++++ 20	++++ 20	++++ 20	++	++
82	++++ 30	++++ 30	++++ 30	-	-
83	++++ 20	++++ 40	++++ 40	-	-
84	++++ 40	++++ 60	++++ 60	++	++
85	+++ 10	+++ 20	+++ 20	+	+
2	++++ 5	++++ 10	++++ 30	-	-
3	++++ 20	++++ 40	++++ 60	++	++
4	++++	++++	++++	-	-
7	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-

waren 11 Tage alt.

Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in Tabelle 11 zusammengestellt worden (siehe nächste Seite).

Aus Tabelle 11 ersieht man, daß die Agglutinationen bei allen tuberkulösen Hühnern innerhalb einer Minute eintraten und bei fast allen Tieren von feiner, körniger Beschaffenheit waren. Eine Ausnahme mit spontaner, starker, flockiger, grober Ausfallung bildeten die Tiere Nr. 79, 80 und 4. Bei den tuberkulosefreien Kontrolltieren traten keine Agglutinationen auf.

Auf die Tuberkulinierung reagierten von 21 tuberkulösen Hühnern nur 7 Tiere deutlich und 2 Tiere stark positiv. Bei 12 Hühnern zeigte sich keine Reaktion, ebensowenig bei den gesunden Kontrolltieren Nr. 7 und 8.

Bei der Zerlegung wurden makroskopisch bei 14 Hühnern tuberkulose Veränderungen festgestellt. 2 Hühner der Versuchsreihe, die vor Anstellung der Versuche verendet waren, wiesen ebenfalls Tuberkulose auf. Bei 7 Tieren lagen makroskopisch keine tuberkulösen Veränderungen vor. Kulturell gelang jedoch in allen Fällen der Nachweis von Geflügeltuberkelbakterien aus Organen.

4. Versuchsreihe: Es wurden laufende Frischblut-Agglutinationen an 30 Hühnern durchgeführt, denen am 26. 1.1961 zur Virulenzprüfung Geflügeltuberkelbakterien (0, 1 mg) intravenös verabreicht worden waren. Alle Tiere verendeten im Verlaufe von 8 Wochen und zeigten bei der Zerlegung mehr oder weniger deutlich ausgeprägte tuberkulöse Veränderungen.

Die zu den Agglutinationen verwendeten Bakterienaufschwemmungen waren nach dem bisherigen Verfahren am 23. 1. 1961 hergestellt worden ("Hohn-Gottsacker"-Nährboden, Abtötung mit 1 %iger Formaldehydlösung).

Die Ergebnisse sind in den Tabellen 12, 13 und 14 zusammengestellt worden.

Aus den Tabellen 12, 13 und 14 geht hervor, daß vor der Infizierung vorgenommene Agglutinationen mit den drei stabilen Antigenen bei sämtlichen Tieren negativ verliefen.

Eine Woche nach der intravenösen Infektion agglutinierten alle Tiere mit den 3 Antigenen, die 10 Tage alt waren, mit Ausnahme des Tieres Nr. 106 sehr heftig innerhalb von 5 Sekunden. Die Agglutinationen bei Antigen Av 1 und Av 235 waren grob (g), flockig und sahen aus wie geronnene Milch. Die Reaktionen mit dem Stamm Av 10 besaßen feineren Charakter (f). Sonstige Unterschiede in der Intensität der Reaktionen der einzelnen Stämme waren nicht vorhanden.

Tabelle 11: Ausfall von Agglutination, Tuberkulinprobe und Sektion nach weiteren 4 Wochen (24. 1. 1961)

Nr. der Fußmarke	Ergebnis der Frischblut-Agglutination mit Antigen Av 1	Av 10	Av 235	Tuberkulinprobe	Path.-anatom. Befund
66	++++	++++	++++	-	-
67	++++	++++	++++	-	+ Le, Mi, Da
68	++++	++++	++++	-	-
69	++++	++++	+++	+	-
70	++++	+++	+++	-	-
71	++++	++++	+++	-	+ Le, Mi
72	++++	++++	++++	+	+ Le, Mi, Lu
73	verendet 13. 1. 1961			0	+ Le
74	++++	+++	+++	+	-
75	++++	++++	++++	++	+ Le, Mi
76	+++	++	+++	+	-
77	verendet 18. 1. 1961			0	+ le, Mi
78	+++	++++	+++	-	+ Le, Mi
79	++++ stark	++++	++++	+	+ Le, Da, Mi
80	++++ sehr stark, grob	++++	++++	++	+ Le, Mi, Lu
81	++++	++++	+++	-	+ Le, Lu
82	++++	++++	++++	+	+ Le, Mi, Lu
83	++++	++++	++++	-	+ Le, Mi vergr.
84	++++	++++	+++	+	+ Le, Mi
85	++++	+++	++++	-	-
2	++++	++++	++++	-	+ Le, Mi, Lu
3	++++	++++	++++	-	+ Le, Mi, Lu
4	++++	++++	++++	-	+ Le, Mi, Da
7	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-

Tabelle 12: Der Ausfall einer Frischblut-Agglutination mit Antigen Av 1 bei intravenös mit 30 verschiedenen Geflügeltuberkelbakterienstämmen infizierten Hühnern

Tier Fußmarke Nr.	Ergebnis der Frischblut-Agglutination vor der Infektion	nach der Infektion 1. Wo.	2. Wo.	3. Wo.	4. Wo.	5. Wo.	Ergebnis einer intracut. Kehllappenprobe 3 Wo. p. inf.
101	-	++++g	++++g	Exitus			0
102	-	++++	++++g	++++g	++++g	Exitus	-
103	-	++++	++++	++++g	++++g	Exitus	-
104	-	++++f	++++f	++++f	Exitus		-
105	-	++++g	++++g	++++	Exitus		-
106	-	-	++++g	++++f	+++f	-	+++
107	-	++++g	++++g	++++f	++++f	++++g	-
108	-	++++	Exitus				0
109	-	++++	++++	Exitus			0
110	-	++++g	++++g	++++	Exitus		+
111	-	++++	++++g	++++g	++++g	Exitus	-
112	-	++++g	++++f	++++f	Exitus		-
113	-	++++g	++++g	++++g	++++g	+++f	-
114	-	++++g	++++g	++++f	++++f	Exitus	-
115	-	++++g	++++g	++++g	Exitus		-
116	-	++++g	++++g	++++f	Exitus		-
117	-	++++g	++++g	++++g	++++g	++++g	±
118	-	++++g	+++f	+++f	++++g	++++g	+
119	-	++++g	++++g	++++g	++++g	Exitus	-
120	-	++++g	++++f	++++f	++++g	Exitus	-
121	-	++++g	++++g	Exitus			0
122	-	++++g	++++g	++++g	++++f	++++f	-
123	-	++++g	++++g	Exitus			0
124	-	++++g	++++g	++++f	++++f	++++f	-
125	-	++++g	+++f	+++f	++++g	++++g	±
126	-	++++g	++++g	++++g	Exitus		-
127	-	++++g	+++f	++++g	++++g	++++g	-
128	-	++++g	++++g	++++g	++++g	Exitus	-
129	-	++++g	++++g	++++g	++++g	Exitus	-
130	-	++++g	++++g	Exitus			0

Tabelle 13: Der Ausfall einer Frischblut-Agglutination mit Antigen Av 10 bei intravenös mit 30 verschiedenen Geflügeltuberkelbakterienstämmen infizierten Hühnern

Tier Fußmarke Nr.	Ergebnis der Frischblut-Agglutination vor der Infektion	nach der Infektion 1. Wo.	2. Wo.	3. Wo.	4. Wo.	5. Wo.	Ergebnis einer intracut. Kehllappenprobe 3 Wo. p. inf.
101	-	++++g	++++g	Exitus			0
102	-	++++g	++++g	++++g	++++g	Exitus	-
103	-	++++f	+++f	+++f	++++f	Exitus	-
104	-	+++f	++++f	++++f	Exitus		-
105	-	++++f	++++f	++++f	Exitus		-
106	-	-	+++f	++++f	++f	-	+++
107	-	++++g	++++f	++++f	++++f	++++g	-
108	-	++++g	Exitus				0
109	-	++++g	++++f	Exitus			0
110	-	++++f	++++f	++++f	Exitus		+
111	-	++++f	++++f	++++g	++++g	Exitus	-
112	-	++++f	++++f	++++f	Exitus		-
113	-	++++f	++++g	++++g	++++g	++f	-
114	-	+++f	++++f	++++f	++++f	Exitus	-
115	-	++++f	++++f	++++f	Exitus		-
116	-	++++g	++++g	++++f	Exitus		-
117	-	++++g	++++g	++++g	++++g	++++g	±
118	-	++++f	++f	++f	++++g	++++g	+
119	-	++++f	++++f	++++g	++++g	Exitus	-
120	-	++++f	++f	++f	++++g	Exitus	-
121	-	++++g	++++f	Exitus			0
122	-	++++f	++++f	++++f	++++f	++++f	-
123	-	++++g	++++f	Exitus			0
124	-	++++f	++++f	++++f	++++f	++++f	-
125	-	++++f	+++f	++++f	++++g	++++g	+
126	-	++++f	++++f	++++g	Exitus		-
127	-	++++f	++++f	++++f	++++g	++++g	-
128	-	++++f	++++f	++++f	++++g	Exitus	-
129	-	++++g	++++g	++++g	++++g	Exitus	-
130	-	++++g	++++f	Exitus			0

Tabelle 14: Der Ausfall einer Frischblut-Agglutination mit Antigen Av 235 bei intravenös mit 30 verschiedenen Geflügeltuberkelbakterienstämmen infizierten Hühnern

Tier Fußmarke Nr.	Ergebnis der Frischblut-Agglutination vor der Infektion	nach der Infektion 1. Wo.	2. Wo.	3. Wo.	4. Wo.	5. Wo.	Ergebnis einer intracut. Kehllappenprobe 3 Wo. p. inf.
101	-	~~++++~~g	~~++++~~g	Exitus			0
102	-	~~++++~~g	~~++++~~g	~~++++~~g	~~++++~~g	Exitus	-
103	-	~~++++~~f	~~++++~~f	~~++++~~g	~~++++~~g	Exitus	-
104	-	~~++++~~f	~~++++~~g	~~++++~~g	Exitus		-
105	-	~~++++~~f	~~++++~~f	~~++++~~f	Exitus		-
106	-	-	~~+++~~f	~~++++~~f	~~++~~f	-	~~+++~~
107	-	~~++++~~g	~~++++~~f	~~++++~~f	~~++++~~f	~~++++~~g	-
108	-	~~++++~~g	Exitus				0
109	-	~~++++~~g	~~++++~~g	Exitus			0
110	-	~~++++~~g	~~++++~~g	~~++++~~g	Exitus		+
111	-	~~++++~~g	~~++++~~f	~~++++~~g	~~++++~~g	Exitus	-
112	-	~~++++~~g	~~++++~~f	~~++++~~f	Exitus		-
113	-	~~++++~~g	~~++++~~g	~~++++~~g	~~++++~~g	~~++~~f	-
114	-	~~++++~~g	~~++++~~f	~~++++~~f	~~++++~~f	Exitus	-
115	-	~~+++~~g	~~+++~~g	~~++++~~g	Exitus		-
116	-	~~++++~~g	~~++++~~g	~~++++~~f	Exitus		-
117	-	~~++++~~g	~~++++~~g	~~++++~~g	~~++++~~g	~~++++~~g	±
118	-	~~++++~~g	~~++++~~f	~~++~~f	~~++++~~f	~~++++~~g	+
119	-	~~++++~~g	~~++++~~g	~~++++~~g	~~++++~~g	Exitus	-
120	-	~~++++~~f	~~++~~f	~~++~~f	~~++++~~g	Exitus	-
121	-	~~++++~~g	~~++++~~g	Exitus			0
122	-	~~++++~~g	~~++++~~g	~~++++~~g	~~++++~~g	~~++++~~g	-
123	-	~~++++~~g	~~++++~~g	Exitus			0
124	-	~~++++~~g	~~++++~~g	~~++++~~g	~~++++~~g	~~++++~~g	-
125	-	~~++++~~g	~~+++~~f	~~++++~~f	~~++++~~g	~~++++~~g	+
126	-	~~++++~~g	~~++++~~g	~~++++~~g	Exitus		-
127	-	~~++++~~g	~~++++~~g	~~++++~~f	~~++++~~g	~~++++~~g	-
128	-	~~++++~~g	~~++++~~f	~~++++~~f	~~++++~~g	Exitus	-
129	-	~~++++~~g	~~++++~~g	~~++++~~g	~~++++~~g	Exitus	-
130	-	~~++++~~g	~~++++~~g	Exitus			0

Zwei Wochen nach der intravenösen Infektion agglutinierten alle lebenden Tiere mit den 3 Antigenen, die 17 Tage alt waren. Die Agglutinationen traten nach 5 Sekunden ein, waren jedoch im allgemeinen nicht mehr so großflockig weiß wie eine Woche zuvor. Ein Tier war in der Zwischenzeit bereits gestorben. Die übrigen Tiere machten einen apathischen Eindruck und hatten blasse Kämme.

Drei Wochen nach der Infektion waren von den 30 Tieren nur noch 24 am Leben. Diese agglutinierten alle mit den 3 Antigenen Av 1, Av 10 und Av 235, die 6 Tage alt waren. Das Antigen Av 1 reagierte in einigen Fällen stärker als die anderen beiden Antigene. Die Verfeinerung der Agglutinationen schritt weiter fort. Einzelne Tiere - Nr. 102, 113, 119, 129 - zeigten jedoch gleichbleibende starke, grobe Ausfällungen. Die Reaktionen traten nach etwa 10 Sekunden ein.

Auf die am gleichen Tage vorgenommene Kehllappenprobe reagierten nur 4 Tiere positiv (Nr. 117, 118, 106, 110) und ein Tier (Nr. 125) fraglich. Alle anderen Tiere zeigten keinerlei Schwellungen am Ort der Injektion des Geflügeltuberkulins.

Vier Wochen nach der Infektion waren noch 17 Tiere am Leben. Alle agglutinierten stark positiv mit allen 3 Antigenen. Bemerkenswert war eine vereinzelt festzustellende stärkere Ausfällung mit gröberem Charakter als bei der vorhergehenden Agglutination. Deutlich zeigten dies die Tiere Nr. 118, 120, 125, 127 und 128. Die Agglutination fiel auch bei den sich im Verenden befindenden Tiere Nr. 122, 125 und 129 eindeutig positiv aus.

Fünf Wochen nach der intravenösen Infektion waren nur noch 9 Hühner am Leben. Von diesen Tieren, die mit 2 Ausnahmen in kachektischem Zustand waren (Nr. 106 und Nr. 118), agglutinierten 8 eindeutig, ein Tier (Nr. 106) nicht. Die im allgemeinen feinstrukturierten, körnigen Agglutinationen zeigten sich sonst unverändert deutlich.

5. Versuchsreihe: In einem als verseucht bekannten Zuchtbetrieb in Oberbayern wurden 371 Hühner mit einem 18 Tage alten Antigen des Stammes Av 1 untersucht. Die Tiere waren 1 - 2 Jahre alt und in 2 verschiedenen Ställen untergebracht. Der Bestand war in den vergangenen Jahren schon 3mal mit Hilfe der Tuberkulinprobe untersucht worden. Dabei wurden jedesmal aufs neue tuberkulös infizierte Hühner entdeckt.

Die Blutentnahme erfolgte mit einer üblichen Lanzette (Firma Stieffenhofer)

aus der Flügelvene. Die Agglutination wurde nicht wie sonst auf einem Objektträger, sondern in einer Agglutinationsschale vorgenommen, die auf einer Gummiwärmflasche lag.

Gleichzeitig wurden die Tiere auch tuberkulinisiert. In der Agglutinationsprobe reagierten 5 Tiere positiv und 9 Tiere fraglich. Auf die Tuberkulinprobe reagierten 14 Tiere positiv.

In keinem der Fälle betrafen die Reaktionen das gleiche Tier.

6. Versuchsreihe: Während in den vorausgehenden Untersuchungen die Agglutinationsprobe der Tuberkulinkehllappenprobe erheblich überlegen war, konnte sie in der 5. Versuchsreihe nicht befriedigen. Es wurde deshalb vermutet, daß das verwandte Antigen geschädigt war. Um diese Vermutung nachzuprüfen, wurden deshalb an Hühnern, die an das Institut für Tierpathologie lebend eingeschickt worden waren, vergleichende Agglutinationen mit dem alten Antigen, das 1 % Formaldehyd enthielt und einem anderen Antigen, das nur 0,2 % Formaldehyd aufwies, durchgeführt. Gleichzeitig konnte an diesen Hühnern auch die Frage untersucht werden, welchen Einfluß Erkrankungen nicht tuberkulöser Art auf den Ausfall der Agglutination hatten. Die Untersuchungsergebnisse sind in Tabelle 15 zusammengestellt worden.

Aus dieser Tabelle ergibt sich, daß die 2 tuberkulösen Hühner und die 2 tuberkulösen Truthähne eindeutig mit dem Antigen Av 1, das vor 14 Tagen unter Verwendung von 0,2 % Formaldehyd hergestellt worden war, reagierten. Sämtliche Reaktionen mit Antigen Av 1, das vor 6 Wochen unter Verwendung von 1 % Formaldehyd hergestellt worden war, verliefen negativ. Eine Ausnahme machten die Reaktionen mit den Seren der Truthühner, die zwar positiv ausfielen, jedoch im Vergleich zu denen mit dem 0,2 %ig formaldehydversetzten Antigen Av 1 wesentlich schwächer und feiner waren.

Das Huhn Nr. 1 war nicht tuberkuliniert worden. Die Tiere Nr. 2, 3 und 4 zeigten eine positive Tuberkulinprobe. Sie entstammten einem Bestand - 10 Zwerghühner und 30 Truthennen - in dem früher schon tuberkulöse Hühner festgestellt worden waren. Pathologisch-anatomisch bzw. bakteriologisch (mikroskopisch oder kulturell) ist bei den Tieren 1 bis 4 Tuberkulose festgestellt worden.

Die an anderen Krankheiten leidenden nicht tuberkulösen 13 Hühner reagierten mit beiden Antigenen in der Agglutination stets negativ.

Tabelle 15: Vergleichende Agglutinationsversuche mit 1,0 % und 0,2 % Formaldehyd enthaltendem Antigen an tuberkulösem und nichttuberkulösem Geflügel

Huhn Nr.	Rasse	Alter	Tuberkulinprobe	Ausfall d. Agglutination mit Antigen 1%Form.	0,2%Form.	pathol.-anatom. bzw. bakteriolog. Befund
1	Ital.	2	+	-	++++	Tuberkulose
2	Zwerghuhn	1	+	-	++++	Tuberkulose
3	Truthahn	2	+	-	+++	Tuberkulose
3	Serum			+++ fein	++++	
4	Truthahn	2	+	+	+++	Tuberkulose
4	Serum			+++ fein	++++	
5	Ital.	2	-	-	-	Leukose
6	Hampshire	3	-	-	-	Pullorum
7	Ital.	1	-	-	-	Leukose
8	Ital.	2	-	-	-	Marek'sche Lähme
9	Ital.	1	-	-	-	Lähmungen
10	Ital.	3	-	-	-	Vergiftung
11	Rhodeländ.	2	-	-	-	Leukose
12	Ital.	1 1/2	-	-	-	Kokzidien
13	Ital.	2 1/2	-	-	-	Pullorum
14	Hampshire	2	-	-	-	Lähmungen
15	Ital.	3	-	-	-	Gicht
16	Leghorn	2	-	-	-	Kokzidien
17	Ital.	2 1/2	-	-	-	Marek'sche Lähme

IV. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

1.) Selektion zur Antigenherstellung brauchbarer Stämme

Eine Selektierung von Kulturen, die sich zur Antigenherstellung eignen - aus einer Sammlung von 25 Stämmen - erfolgte durch Züchtung auf verschiedenen Nährböden. Durch die Verwendung unterschiedlicher Nährmedien ließ sich eine nähere Bestimmung der zwischen den Wuchsformen "S" - "R-S" - "R" variierenden Kulturen und der damit zusammenhängenden Eigenschaften, wie Suspendierbarkeit, Agglutinationsvermögen und Stabilität, erreichen. Der Grund hierfür dürfte in dem verschieden hohen Glyceringehalt der Nährböden zu suchen sein, der eine Verschiebung der Wuchsform von "S" zu "R" bewirkte und so weit führte, daß sich die Bakterien zwar noch suspendieren ließen, jedoch bei Zugabe von physiologischer NaCl-Lösung spontan agglutinierten (Glycerin-Bouillon-Nährboden), oder daß zuletzt überhaupt keine Suspendierung mehr möglich war (Sauton-Nährboden).

Während die Kulturen auf "Gottsacker-Nährboden" noch in weichen, schmierigen Belägen wuchsen, die sich schon durch Schütteln mit der Hand homogen aufschwemmen ließen, zeigten diese bei glycerinhaltigeren Nährböden eine kompaktere, trockenere Form (Löwenstein-Jensen-Nährboden), erhielten zuletzt eine zähe, klebrige Beschaffenheit (Petragnani) und ließen sich nur noch mit Hilfe eines Glasstabes zerreiben.

Damit verbunden wurde das Auftreten von Selbstagglutinationen (nach Zugabe von physiologischer NaCl-Lösung) beobachtet, die bei Züchtung auf "Löwenstein-Jensen" noch vereinzelt vorkamen, sich bei Verwendung von "Petragnani" wesentlich verstärkten, bis sich nach Bebrütung auf "Besredka" nur noch 6 Kulturen zur Antigenherstellung eigneten. Die eigentlichen Ursachen dieser Selbstagglutination dürften in den typenspezifischen Eigenschaften der einzelnen Bakterienstämme zu suchen sein und konnten nicht näher ermittelt werden. Für diese Auffassung spricht auch die Tatsache, daß enge Beziehungen zwischen dem Verhalten der Kulturen bei der Züchtung (bzw. Suspension) und dem bei den Agglutinationen mit Blut und Seren beobachteten, festgestellt werden konnten.

So zeigten Stämme, die nach Züchtung auf Löwenstein-Jensen mit Blut gesunder Hühner reagiert hatten (Nr. 4, 7, 8, 9) oder ein zu schwaches Agglutinationsvermögen aufwiesen (alle Stämme außer Nr. 1, 10, 235) durch Verwendung von Petragnani-Nährboden entweder Selbstagglutination bei der Suspension oder eine Änderung der Wuchsform von "S" zu "R" (Nr. 8, 273, 301).

Nur 3 Stämme (Nr. 1, 10, 235) erwiesen sich nach Züchtung auf 4 verschiedenen Nährböden stabil und zeigten eine starke Agglutinabilität, die zwar mit Serum von tuberkulös infizierten Kaninchen, doch nicht mit dem gesunder Hühner zu Reaktionen führte. Ein wesentlicher typenspezifischer Unterschied dieser 3 Stämme war nicht vorhanden, so daß sich die Anwendung eines polyvalenten Antigens bei den hier angestellten Agglutinationen erübrigte.

2.) Antigen-Herstellung

Die Empfindlichkeit und Labilität der Bakteriensuspensionen zeigte sich deutlich an den Versuchen, die zur Herstellung eines für die Praxis verwendbaren Antigens nötig waren. So wurde eine Abtötung der Bakterien durch Erhitzen zwar erreicht, doch traten dabei Bakterienverklumpungen auf, die die Testflüssigkeit für eine Verwendung bei der Agglutination zwar nicht ausschlossen, aber eine sichere Beurteilung der Reaktion fast unmöglich machten.

Weder durch Schütteln mit Glasperlen - wodurch nur eine feinere Homogenisierung der Bakterienausfällung erreicht wurde - noch durch oberflächenentspannende Mittel, wie Tween 80, ließen sich die Veränderungen der Aufschwemmungen beheben. Die zur Antigen-Herstellung verwandten Zusätze von 0,5 % Phenol und 0,4 % Natriumzitrat konnten als Ursache der Bakterienausflockungen ausgeschieden werden.

Durch Zentrifugieren oder längeres Stehenlassen (Sedimentieren) ließ sich eine Absonderung der groben ausgeflockten Teile erreichen. Eine Verwendung der Suspension als Antigen wurde dadurch wieder möglich, doch verlängerte sich die Reaktionszeit bei der Agglutination erheblich infolge der eingetretenen Suspensionsverdünnung. Der optimale Reaktionsverlauf mit der bestmöglichsten Beurteilung erfolgte bei einer Bakteriensuspension von etwa 10 %.

Bei der Herstellung der Suspension traten öfters Fasern, Flocken oder Schlieren auf, die sich nur durch angestrengtes Zerreiben mit Hilfe des Glasstabes auflösen ließen und deren Ursache nicht genau ermittelt werden konnte.

Züchtungsversuche bei 30° C und 37° C mit wechselnder Bebrütungsdauer zeigten, daß die Bakterien bei 37° C 30 Tage lang gezüchtet werden müssen, um eine Suspension zu ermöglichen oder eine Flocken- oder Schlierenbildung bei der Zerreibung auszuschließen.

Eine Abtötung der Bakterien, die keine sichtbaren Antigenschädigungen her-

vorrief, erfolgte durch eine 1 %ige Formaldehydkonzentration innerhalb von 48 Stunden. In der Verträglichkeit hoher Formaldehydkonzentrationen zeigten sich deutliche antigene Unterschiede der 3 stabilen Stämme. Während Antigen Nr. 1 100 %iges Formalin noch vertrug und mit Blut und Seren agglutinierte, blieben die Antigene Nr. 10 und Nr. 235 nur noch bei einer Konzentration von 4 % bzw. 5 % Formaldehyd stabil. Die Labilität dieser 2 Stämme zeigte sich im Auftreten von Flocken und Schlieren sowie erschwerter Zerreibung bei Zugabe von hohen Formaldehydkonzentrationen.

Bei Verwendung von Antigenen, die mit 0,5 % Phenol oder 1 %igem Formaldehyd versetzt waren, zeigte sich während der ersten Zeit kein Unterschied in der Art der Agglutinationen. Erst nach etwa 3 Wochen trat durch die 1 %ige Formaldehydkonzentration eine Antigenschädigung ein, die zwar noch Agglutinationen mit Seren, doch nicht mehr mit Blut ermöglichte (5. und 6. Versuchsreihe, Hühner).

Es kann erwartet werden, daß die Auswirkung einer 0,2 %igen Formaldehydlösung auf die antigene Struktur der Bakterien, die dadurch in 12 Tagen abgetötet werden, geringer sind. Vielleicht empfiehlt es sich aber, das Formalin ganz auszuwaschen oder zu neutralisieren, um Antigenschädigungen zu vermeiden.

Die größte Menge Bakterienmaterial erhielt man bei Züchtung in Röhrchen à 5 ccm "Hohn-Gottsacker"-Nährboden. Beimpfungen größerer Platten zeigten nicht den gewünschten Erfolg. Nach 6 Monaten Aufbewahrungszeit im Kühlschrank bei +4° C waren Antigene mit 0,5 %iger Phenolkonzentration noch voll verwendungsfähig und zeigten keine Veränderungen.

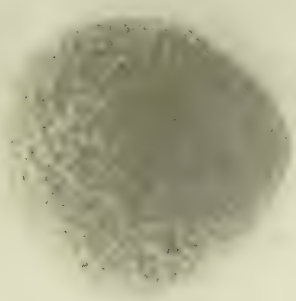
Den typischen positiven und negativen Ausfall einer Agglutinationsprobe mit Frischblut zeigen die Abbildungen 1 und 2. (Seite 43)

3.) Agglutinationen

Auch durch die Agglutinationen mit Frischblut zeigten sich antigene Unterschiede der 3 Stämme. So agglutinierte Antigen Nr. 10 im allgemeinen feiner als die beiden anderen. Variierende Intensität und Beschaffenheit der Reaktionen dürften durch verschiedenen Antikörpergehalt im Blut bedingt sein. Kurz nach der Infizierung traten die Agglutinationen spontan in groben, weißen Flocken auf und wurden im Laufe der Zeit feiner und gekörnter. Bei einzelnen Tieren verliefen die Reaktionen jedoch gleichmäßig grobflockig. 2 Tage nach der Tuberkulinierung vorgenommene Agglutinationen traten rascher und stärker auf, was für eine Aktivierung der Antikörper durch den erkrankten Organismus spricht.

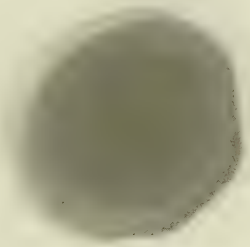
Frischblut-Schnellagglutination

Abbildung 1:



Zu Abb. 1: positive Reaktion mit Frischblut eines Huhnes, das tuberkulin-positiv war und bei der Sektion typische tuberkulöse Veränderungen aufwies. Eintritt der Reaktion nach etwa 10 Sekunden.

Abbildung 2:



Zu Abb. 2: Negative Reaktion mit Frischblut eines Huhnes, das tuberkulin-negativ war und bei der Sektion keinerlei Veränderungen aufwies.
Die photogr. Aufnahme erfolgte etwa 10 Min. nach Blutentnahme, um die sichere Abwesenheit einer Verklumpung zu demonstrieren

Beobachtungen an tuberkulösen Hühnern zeigten, daß der allergische Zustand der Hühner ständig wechselte. Tiere, die anfänglich stark auf die Tuberkulinprobe angesprochen hatten, zeigten nach 14 Tagen keinerlei Reaktion mehr.

Von 55 natürlich und experimentell infizierten Hühnern reagierten auf eine intrakutane Tuberkulinierung 13 Tiere positiv und ein Tier fraglich. Doch alle 55 Tiere zeigten bei der Agglutinationsprobe deutliche Reaktionen, die innerhalb von 30 Sekunden eintraten. Von 63 Tieren, die alle negative Agglutinationsergebnisse zeigten, reagierte kein einziges auf die Tuberkulinierung, was für eine hohe Spezifität der Agglutinationsprobe spricht.

Eine Ausnahme von diesen günstigen Ergebnissen bildeten die Befunde der 5. Versuchsreihe, bei der von 371 Tieren eines Zuchtbetriebes 14 auf die Tuberkulinierung und nur 5 auf die Agglutinationsprobe reagiert hatten. In keinem der Fälle war auch eine Identität der Untersuchungsergebnisse festzustellen. Es konnte jedoch nachgewiesen werden, daß der Grund hierfür in der relativ hohen Formaldehydkonzentration der Suspension lag (1 %), die eine Schädigung der antigenen Eigenschaften bewirkte.

Unter den 55 Tieren, die auf die Agglutinationsprobe positiv reagiert hatten, befanden sich 30 Hühner, die artifiziell infiziert worden waren (4. Versuchsreihe). Sämtliche 30 Hühner zeigten bei der Sektion typische tuberkulöse Veränderungen an Leber, Lunge und Milz. Auch die mikroskopischen und kulturellen Befunde waren sämtlich positiv. Von den restlichen 25 Tieren zeigten bei der Sektion 18 Hühner tuberkulöse Veränderungen an Leber, Lunge, Milz und Darm. Eine bakteriologische Untersuchung der 7 Hühner, die ein negatives Sektionsergebnis gezeigt hatten, fand nicht statt; doch besteht nach den bisherigen Erfahrungen die hohe Wahrscheinlichkeit, daß auch diese Tiere an Tuberkulose erkrankt waren, da sie aus verseuchten Beständen stammten und sowohl in der Tuberkulinprobe als auch in der Agglutinationsprobe positiv reagiert hatten.

Die Ergebnisse sprechen somit für eine hohe Spezifität der Frischblut-Schnellagglutination. Agglutinationsversuche an 14 Hühnern, die an Leukose, Pullorum, Kokzidien, Vergiftungen, Marek'scher Lähme, Gicht erkrankt waren, verliefen stets negativ.

Hervorgehoben zu werden verdient die Tatsache, daß die Agglutinationsprobe auch bei tuberkulinanergischen, hochkachektischen und moribunden Hühnern stets positiv ausfiel.

V. ZUSAMMENFASSUNG

1.) Unter 25 Stämmen von Mycobacterium avium wurden 3 Stämme ausgewählt, die sich durch Fehlen von Auto-Agglutination, gute Homogenisierbarkeit, Stabilität und spezifisches Agglutinationsvermögen zur Antigenherstellung für eine Frischblut-Schnellagglutination eigneten.

2.) Aus diesen Stämmen wurden nach Züchtung auf geeigneten Nährmedien und unter Verwendung von Zusätzen, welche eine Blutgerinnung verhinderten und die Keimaufschwemmung haltbar machten, Antigene hergestellt.

3.) Mit diesen Antigenen wurden vergleichende Untersuchungen über die Leistungsfähigkeit der Frischblut-Schnellagglutination und der Tuberkulinprobe an 118 Hühnern durchgeführt. Dabei kam es bei 55 Hühnern zu einem deutlichen positiven Ausfall der Agglutinationsprobe. Auf die intrakutane Kehllappenprobe mit Geflügeltuberkulin reagierten dagegen nur 13 Tiere positiv und ein Tier fraglich. Bei 63 Tieren fielen beide Untersuchungsmethoden negativ aus.

4.) Von den 55 Hühnern, die auf die Agglutinationsprobe positiv reagiert hatten, zeigten 48 Tiere bei der Sektion typische tuberkulöse Veränderungen an Leber, Milz, Lunge oder Darm, die mikroskopisch und kulturell bestätigt werden konnten.

7 Hühner wiesen ein negatives Sektionsergebnis auf. Sie wurden bakteriologisch nicht untersucht, doch bestand größte Wahrscheinlichkeit einer Erkrankung an Tuberkulose, weil die Tiere aus einem verseuchten Bestand stammten und tuberkulin-positiv reagiert hatten.

5.) Ein Formaldehyd enthaltendes Antigen verlor im Laufe von 3 Wochen einen hohen Anteil seines Agglutinationsvermögens. Unter 371 untersuchten Hühnern, von denen 14 auf die Tuberkulinprobe positiv reagierten, wurden nur in 5 Fällen noch positive Agglutinationen festgestellt.

6.) Die Tuberkulinierung bewirkte eine Aktivierung der Antikörper des tuberkulösen Organismus, die sich 48 Stunden nach der Injektion des Tuberkulins in einer verstärkten Agglutination äußerte.

7.) Die Untersuchungen zeigten, daß die Frischblut-Schnellagglutination eine hohe Spezifität besitzt. Sie zeigte sich bei der Diagnose der Geflügeltuberkulose leistungsfähiger als die Tuberkulinprobe. Die Frage der Haltbarkeit des Antigens erfordert noch weitere Untersuchungen.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

1. Abel, G.: Versuche einer Differenzierung der säurefesten Bakterien mittels des Agglutinationsverfahrens. Verschiedenheiten im antigenen Aufbau von Gallinaceusstämmen und ihren S- und R-Varianten. Zbl. Bakt. I. Orig. 145, 128 (1940)

2. Bauer u. Zimmermann: Verhütung und Bekämpfung der Geflügelkrankheiten. Verl. Ulmer, Stuttgart 1951

3. Bergmann, J.: Berl.-Münch. Tierärztl. Wschr. 61, 93 (1953)

4. Chiti, G.: Versuche einer Differenzierung der säurefesten Bakterien mittels des Agglutinationsverfahrens. Die Unterscheidung der Tuberkelbazillen des Typus gallinaceus von Säugetiertuberkelbazillen. Zbl. Bakt. I. Orig. 142, 305 (1938)

5. Creanga, E., Cupsa, V.: Ref. Landwirtschaftl. Zbl. IV, 4, 876 (1959)

6. Eissner, G.: Zbl. Bakt. I. Orig. 164, 129 (1955)

7. Feldmann, W.H.: Diseases of poultry edited by Biester and Schwarte, Ames, Iowa 1952

8. Fomina, A.J., Kontrimawitschuss, L.M., Prochorov, A.W.: Zur Herstellungsmethodik des Tuberkuloseantigens. Landwirtschaftl. Zbl. IV, 6, 310 (1961)

9. Fritzsche, K., Unruh, W.: Untersuchungen über eine Verbesserung der Technik der Tuberkulin-Kehllappenprobe beim Huhn. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 71, 303 (1958)

10. Geurden, L.: Vlaamsch Diergeneeskundig Tijdschrift, III/Mei, 1934

11. Gylstorff, I.: Krankes Geflügel. Verl. Fr. Pfennigstorff, 7. Aufl. 1957

12. Karlson, A.G., Zinober, M.R. and Mann, F.C.: A Whole Blood Rapid Agglutination Test for Avian Tuberculosis. Amer. J. Vet. Res. 11, 137 (1950)

13. Klein, H. u. Steffke, E.: Zur epizootologischen Bedeutung der Geflügeltuberkulose und über die diagnostische Leistungsfähigkeit der intrakutanen Allergieprobe beim Huhn. Mh. Vet. med. 14, 142 (1959)

14. Meyn, A. u. Schliesser, Th.: Mh. f. Tierhkde. 8, 157-170 (1956)

15. Moses, H.E., Feldmann, W.H. and Mann, F.C.: Mycobacterial Rapid Agglutination Antigens and Their Diagnostik Value in Tuberculosis of Fowl. Amer. J. Vet. Res. 4, 390 (1943)

16. Prochorov, A.V.: Neue Methode der Tuberkulose-Diagnostik bei Hühnern zu Lebzeiten. Zs. Veterinarijn, 35, 60 (1958)

17. Rheinhard, R.: Lehrbuch der Geflügelkrankheiten. Verl. M. u. H. Schaper, Hannover 1950

18. Rotow, W.J.: Über die Tuberkulinisierung der Enten. Ref. Landwirtschaftl. Zbl. IV, 2, 896 (1957)

19. Schimpl, M.: Vet. Med. Diss. München 1955

20. Stschepilow, N.S.: Zur Diagnostik der Tuberkulose bei Puten. Ref. Mh. Vet. Med. 15, 460 (1960)

L e b e n s l a u f

Am 11. 7. 1934 wurde ich, Kurt Hiller, in Riedlingen/Wttbg. als Sohn des Schäfers Fritz Hiller und seiner Ehefrau Kreszentia, geb. Herzer, geboren. Von 1940 - 1945 besuchte ich die Volksschule und von 1945 - 1954 das Gymnasium in Riedlingen. In München und Berlin studierte ich Tiermedizin und beendete die Staatsprüfung im Februar 1959 in München. Nach Ableistung meiner Praktikantenzeit war ich anschließend noch ein Jahr in der Praxis tätig.

Vorliegende Arbeit begann ich im Sommer 1960 am Institut für Tierhygiene der Universität München und beendete sie ein Jahr später.